

MARCOS JOSÉ MACHADO

Efeito do Oxigênio sobre a Expressão de  
Oxidases em *Neurospora crassa*

Tese apresentada ao Departamento de Bio-  
química da Universidade Federal do Paraná,  
para obtenção do título de Mestre em Bio-  
química.

CURITIBA  
1989

Tese orientada pela

Dra. GLACI THEREZINHA ZANCAN

"Tudo é possível àquele que crê!"

(Mc 9,23b).

A Deus por ter criado o céu e a terra, o animal e o vegetal, a bactéria e o fungo.

À Dra. Glaci Zancan, por ter mostrado que era possível, pela dedicação a ciência, pela nobreza de caráter, pelos exemplos de vida.

À Márcia Helena Mendonça, por sua mágica em me fazer sorrir e crer.

Aos meus pais, Estelita e Milton, pela alegria de ser vosso filho.

Com amor esta tese vos pertence.

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Glaci Therezinha Zancan, pela orientação desta tese.

Ao Dr. Shigehiro Funayama, pela leitura crítica desta tese, pelas sugestões apresentadas, pelo empréstimo de equipamentos, e por sua humildade, um exemplo de vida.

À Dra. Liu Un Rigo, pelas informações e sugestões recebidas pelo empréstimo de equipamentos, e por sua amizade durante o curso.

Ao Dr. Fábio O. Pedrosa, pelas sugestões recebidas, pelo empréstimo de equipamentos e reativos, e por seu criticismo, um exemplo profissional.

À Dra. Déa Amaral do Amaral, pelas sugestões e contribuições no desenvolvimento da tese, pelo empréstimo de reativos e equipamentos, e por sua candura durante a realização dos experimentos.

Ao Dr. Annibal de Paiva Campello e Dr. Marcello Iacomini, coordenadores do curso de pós-graduação em Bioquímica durante a realização do curso, pelo apoio e atenção dispensados.

Ao Dr. José Domingos Fontana, chefe do departamento de Bioquímica, por sua solidariedade, e por sua perseverança, um exemplo profissional.

Aos demais professores do departamento de Bioquímica que transmitiram a mágica do conhecimento.

À Doroty Kubicki, Mestre em Bioquímica, funcionária do departamento de Bioquímica, por suas valiosas contribuições sobre fisiologia dos microrganismos e por sua amizade.

Ao amigo Geraldo Picheth, mestrando em Bioquímica, por seu companherismo, e por suas sugestões durante a realização do curso.

À Márcia e à Iara, colegas de laboratório e curso, pela amizade e auxílios nos experimentos; ao Hidevaldo, Emanuel, Jaísa, Cida,

Eneida, Berenice, Alice, Ilma, Marcelo, Elisa, Nina, Maria Célia, Aneli, Nancy, Ivone, Angelita, Sérgio, Roberto, Geny, Maria Helena, Renato, Nilce, e demais colegas de curso pelo companherismo.

À sra. Julieta Pie, e à sra. Marilza D. Lamour, e demais funcionários do departamento e curso de pós-graduação em Bioquímica, pela solidariedade e ajuda demonstradas.

À d. Zulmira e à d. Margarida, por manterem a vidraria limpa.  
Ao Dalton, pela confecção dos gráficos.

Aos Farmacêuticos-bioquímicos, proprietários do "Paranálize", Laboratório de análises, Jussara, Luiz Ernani e Luiz Emiliano, pela valiosa ajuda na época de inscrição no curso, e pela amizade.

À Bernadete Zucco, mestranda em Lingüística, por sua atenção na correção da língua portuguesa desta tese, e por uma longa amizade de coração.

Aos diretores da "Parsec- materiais de laboratório", Albino, Mauro e Rubens, pelo apoio na época de inscrição no curso.

As minhas irmãs, Clarice, datilógrafa desta tese, e Clarete, pelas muitas alegrias e apoio durante a realização do curso.

À minha avó Sebastiana, e ao Marcelo, Toni, Cida, Rubens, Clarice, Marcial, Gina, Júnior e Liz, meus irmãos, cunhadas e sobrinhos pelo estímulo e apoio durante o curso.

Aos meus grandes amigos, Luiz, Rosinete, Maike, Dimas, Karin e Milda, por estarem sempre no meu caminho, sorrindo.

À minha primeira professora, Srta. Elza Lira, por me ensinar o "abc" e amar os livros.

À Universidade Federal do Paraná.

Ao CNPq. pelo suporte financeiro durante o período de curso.

À Deus por sua sempre presença no meu caminho.

## SUMÁRIO

	página
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	7
1.2. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS DO METABOLISMO NITROGENADO EM <u>Neurospora crassa</u> .....	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1. REAGENTES.....	11
2.2. MICRORGANISMO.....	11
2.3. MEIO DE CULTIVO.....	11
2.3.1. Meio N de Vogel.....	12
2.3.2. Meio de indução.....	13
2.4. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E CULTIVO DE <u>Neurospora</u> <u>crassa</u> .....	13
2.4.1. Conservação das amostras.....	13
2.4.2. Obtenção de conídios.....	14
2.4.3. Contagem de conídios.....	14
2.4.4. Condições de germinação dos conídios.....	14
2.4.5. Obtenção da suspensão de células.....	15
2.4.6. Indução de enzimas em células não proliferantes..	15
2.4.6.1. Meio mínimo livre de íons amônio.....	15
2.4.6.2. Meio mínimo contendo íons amônio.....	15

	página	
2.4.7.	Ajuste da tensão de oxigênio na fase gasosa.....	16
2.5.	DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA MASSA MICELIAL.....	16
2.6.	PREPARO DO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS.....	17
2.6.1.	Para a enzima L-aminoácido oxidase.....	17
2.6.2.	Para a enzima urato-oxidase.....	17
2.6.3.	Para a determinação dos níveis internos de amônio e aminas.....	18
2.7.	DETERMINAÇÃO DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE.....	18
2.8.	DETERMINAÇÃO DA URATO-OXIDASE.....	19
2.9.	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	20
2.10.	DETERMINAÇÃO DE SACAROSE NO MEIO DE CULTIVO.....	20
2.11.	DETERMINAÇÃO DE AMINAS.....	20
2.12.	DETERMINAÇÃO DE AMÔNIO.....	20
2.13.	DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO.....	21
2.14.	DETERMINAÇÃO DE PEROXIDASE NOS EXTRATOS LIVRE DE CÉLULAS.....	21
2.15.	DETERMINAÇÃO DO pH NO MEIO DE CULTIVO.....	21
2.16.	DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS NO MEIO DE CULTIVO.....	22
2.17.	NÚMERO DE EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	22
3.	RESULTADOS.....	23
3.1.	ESTUDOS COM A LINHAGEM SELVAGEM.....	23
3.1.1.	Cinética de indução.....	23
3.1.2.	Efeito da tensão de oxigênio na expressão das enzimas.....	24
3.1.3.	Indução em presença de íons amônio.....	25
3.1.3.1.	Efeito da concentração de amônio.....	25
3.1.3.2.	Cinética de indução em presença de íons amônio....	26
3.2.	ESTUDOS COM A LINHAGEM MUTANTE <u>nit-2</u> .....	27

	página
3.3. ESTUDOS COM A LINHAGEM MUTANTE <u>nit-4</u> .....	28
3.4. ESTUDOS COM AS LINHAGENS MUTANTES <u>gln-1b</u> , <u>nmr-1</u> ( alelos V2M304 e MS5) e <u>en(am)1</u> .....	29
4. DISCUSSÃO.....	52
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE TABELAS

	página
I	
EFEITO DO OXIGÊNIO SOBRE OS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE EM CONDIÇÕES DE REPRES- SÃO EM LINHAGENS DE <u>Neurospora crassa</u> .....	32

## LISTA DE FIGURAS

		página
1.	Regulação da expressão dos genes responsáveis pela síntese das enzimas do metabolismo nitrogenado em <u>Neurospora crassa</u> .....	10
2.	Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Linhagem selvagem..	33
3.	Cinética de indução da urato-oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Linhagem selvagem.....	34
4.	Efeito da tensão de oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em condições de indução - Linhagem selvagem.....	35
5.	Efeito da concentração de íons amônio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio- Linhagem selvagem.....	36
6.	Efeito da concentração de íons amônio sobre os níveis de atividade da urato-oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Linhagem selvagem.....	37
7.	Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio em condições de repressão- Linhagem selvagem.....	38
8.	Cinética de indução da urato-oxidase em diferentes tensões de oxigênio em condições de repressão - Linhagem selvagem.....	39
9.	Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Mutante <u>nit-2</u> .....	40
10.	Cinética de indução da urato-oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Mutante <u>nit-2</u> .....	41

	página
11. Cinética de indução da L-aminoácido oxidase a 0,2 e 0,8 atm. de oxigênio - Mutante <u>nit-4</u> .....	42
12. Efeito da tensão de oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em condições de indução - Mutante <u>nit-4</u> .....	43
13. Cinética de indução da urato-oxidase a 0,2 e 0,8 atm. de oxigênio - Mutante <u>nit-4</u> .....	44
14. Cinética de indução da L-aminoácido oxidase a 0,2 e 0,8 atm. de oxigênio em condições de repressão - Mutante <u>nit-4</u> .....	45
15. Cinética de indução da urato-oxidase a 0,2 e 0,8 atm. de oxigênio em condições de repressão - Mutante <u>nit-4</u> .....	46
16. Cinética de indução da L-aminoácido oxidase a 0,2 e 0,8 atm. de oxigênio - Mutante <u>gln-1b</u> .....	47
17. Cinética de indução da L-aminoácido oxidase a 0,2 e 0,8 atm. de oxigênio - Mutante <u>nmr-1</u> (alelo V2M304).....	48
18. Cinética de indução da L-aminoácido oxidase a 0,2 e 0,8 atm. de oxigênio - Mutante <u>nmr-1</u> (alelo MS5).	49
19. Efeito da tensão de oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em condições de indução - mutante <u>nmr-1</u> (alelo MS5).....	50
20. Cinética de indução da L-aminoácido oxidase a 0,2 e 0,8 atm. de oxigênio - Mutante <u>en(am)1</u> .....	51

## RESUMO

Usando células não proliferantes de Neurospora crassa, linhagem selvagem, demonstrou-se que os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase e da urato-oxidase eram duas vezes maiores a 0,8 atm do que a 0,2 atm de oxigênio, em condições de indução. O efeito repressor dos íons amônio foi menor a 0,8 atm de oxigênio do que a 0,2 atm, quando se mediu os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase e da urato-oxidase.

O efeito do oxigênio, também foi observado sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase nas linhagens mutantes: nit-4, gln-1b e nmr-1 (alelos V2M304 e MS5), de Neurospora crassa, em condições de indução e de repressão. Em ambas as condições verificou-se o efeito do oxigênio sobre os níveis de atividade da urato-oxidase em linhagem mutante nit-4.

A linhagem mutante en(am)1 não apresentou efeito do oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em condições de indução e de repressão.

A linhagem mutante nit-2 apresentou o efeito do oxigênio apesar dos baixos níveis de atividade enzimática observados em condições de indução.

## 1. INTRODUÇÃO

Em decorrência das múltiplas variações ocorridas no meio ambiente, os vários seres vivos necessitam de versatilidade adaptativa para poderem sobreviver. É através da existência de um diversificado sistema metabólico que os seres vivos conseguem suportar a adaptação exigida pelo meio.

Os microrganismos durante o processo evolutivo aumentaram suas possibilidades de sobrevivência incrementando seus sistemas fisiológicos diante das condições nutricionais oferecidas por seus vários "habitats". Os nutrientes essenciais para a vida, carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e oxigênio, forçaram o processo adaptativo (63).

Os microrganismos apresentam diferentes graus de reação ao oxigênio molecular. Os aeróbios estritos mostram uma dependência absoluta dele, enquanto que os anaeróbios estritos não o podem tolerar. Determinados anaeróbios estritos podem, no entanto, suportar pequenas concentrações, enquanto que o crescimento dos aeróbios estritos e o das bactérias facultativas é inibido pelo excesso de oxigênio. A variação na concentração de oxigênio leva a mudanças fisiológicas dos organismos possibilitando sua adaptação (63).

A concentração de oxigênio no ar atmosférico é de 21 % (v/v), enquanto sua solubilidade em água, dependente de temperatura, é extremamente baixa, 230  $\mu\text{M}$  a 27 °C (33). Assim, culturas dos vários microrganismos podem sofrer constantes variações nas concentrações deste elemento durante o crescimento, acarretando mudanças no metabolismo das células (63).

O consumo de oxigênio pode ser restringido em baixas concentrações, por sua difusão através do material celular, do mesmo

modo, em altas concentrações, pelos sistemas transportadores de e létrons que limitam sua utilização (36).

Linnane, Vitols e Nowland (38) submeteram o fungo Torulopsis utilis a crescimento anaeróbico e observaram ausência de mitocôndrias e citocromos, demonstrando a necessidade de oxigênio para a formação destas estruturas. Já, Polaskis, Bartley e Meek (48) demonstraram que conforme as condições de crescimento, Saccharomyces cerevisiae apresenta sistemas enzimáticos e desenvolvimento de organelas específicas. Quando Saccharomyces cerevisiae é crescida em meio com galactose como única fonte de carbono, em anaerobiose, não ocorre a síntese de enzimas respiratórias. Mínimas contaminações por oxigênio induzem a biossíntese destas enzimas, sugerindo uma alta sensibilidade desta levedura à indução de sistemas respiratórios pelo oxigênio (56).

Em E.coli, organismo aeróbio facultativo, adaptações ocorrem conforme as condições nutricionais. Há tendência em terem padrões metabólicos característicos de anaeróbios estritos ou de aeróbios estritos, conforme a disponibilidade de oxigênio (64).

A biossíntese das enzimas do ciclo de Krebs em E.coli é também influenciada tanto pela concentração de oxigênio como pelo balanço metabólico, resultante de seu estado nutricional, além da repressão catabólica por glucose. Estes fatos indicam controle por vários mecanismos distintos, mas interrelacionados para as enzimas de um sistema anfibólico (65).

Oxigênio em excesso pode ser tóxico aos organismos (19). Wimpenny (63) define como excesso de oxigênio, a concentração do elemento superior àquela que permita a velocidade máxima de crescimento. O efeito inibitório do excesso de oxigênio varia conforme o tipo de organismos e de seu estágio de desenvolvimento (29,34).

Sordaria fimicola e Aspergillus niger têm seu crescimento suprimido quando submetidos a pressões de 10 atm de oxigênio.

Este efeito é reversível mesmo após 14 dias sobre esta pressão . Quando estes mesmos organismos, são expostos a uma pressão de 10, 5 atm com apenas 2 % de oxigênio, por 120 horas, não há inibição do crescimento, portanto acredita-se ser a concentração excessiva de oxigênio a causa da inibição e não a pressão do ar (05).

Certas bactérias gram negativas, patogênicas, apresentam também reversibilidade no crescimento após terem sido submetidas a altas pressões de oxigênio (26).

De acordo com Fridovich (19), a toxicidade do oxigênio é devido aos intermediários da redução do oxigênio, tais como, íon superóxido, radical hidroxil e ao peróxido de hidrogênio. As enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase aparentemente compõem um elaborado sistema de defesa contra esses metabólitos.

Em conformidade com o grau de tolerância do microrganismo ao oxigênio, a superóxido dismutase, catalase e peroxidase podem apresentar maior ou menor atividade, ou mesmo estar presentes ou ausentes. Assim, Streptococcus sanguis quando crescido aerobicamente produz de cinquenta a cem vezes mais superóxido dismutase do que quando em anaerobiose (19).

O crescimento de fungos aquáticos, anaeróbios facultativos e anaeróbios aerotolerantes é inibido por oxigênio hiperbárico , sendo as atividades de superóxido dismutase, catalase e peroxidase mais baixas do que as observadas com as espécies fortemente oxidativas (44).

Anaeróbios estritos morrem muito mais rapidamente que aeróbios estritos, possivelmente devido à ausência de enzimas como superóxido dismutase, peroxidase e catalase. A patogenia dos microrganismos poderia ter relação direta com a capacidade de produzirem e/ ou secretarem tais enzimas (03).

Bactérias que vivem em águas do lago Hoare da Antártida com altas concentrações de oxigênio dissolvido, possuem diversos

mecanismos de adaptação que lhes permitem sobreviver nestas águas. Dentre os grupos isolados, quatro apresentavam atividade de superóxido dismutase elevada quando cultivadas em meio com altas concentrações de oxigênio dissolvido (42).

A produção de pigmentos fotossintéticos é inibida pelo oxigênio em culturas de Chromatium um anaeróbio estrito, fototrófico (34), e o mesmo ocorrendo para Rhodobacter capsulatus (67). De acordo com Wimpenny (63), a supressão da produção destes cromatóforos bacterianos estaria relacionada com o potencial redox interno da célula. Elevando o potencial redox interno, o oxigênio provocaria uma diminuição nos níveis dos pigmentos anaerobicamente induzíveis. No entanto, Zhu et al. (67) observaram que em R.capsulatus a inibição da biossíntese das estruturas fotossintéticas ocorreria a nível de transcrição de mRNAs, estando estes níveis sujeitos a controle por oxigênio.

Goldberg e Hanau (25) mostraram que a expressão de histidase em Klebsiella pneumoniae é dependente de oxigênio, mesmo em condições de desrepressão por limitação de nitrogênio (amônio) e sugerem que o mecanismo pelo qual o oxigênio altera a expressão de genes relacionados com o metabolismo nitrogenado seja operon específico.

O oxigênio induz uma maior formação de sistema lignolítico de Phanerochaeta chrysosporium. Quando culturas deste fungo são expostas a altas tensões de oxigênio, um aumento na velocidade de degradação de lignina é observado (02).

Em E.coli o oxigênio bloqueia a síntese de nitrato redutase a nível de transcrição e em algum passo final da formação da enzima (37). O produto do gene fnr tem um papel regulatório positivo sobre a expressão desta enzima, e o oxigênio diminui a quantidade do produto deste gene (55, 35).

Yamamoto e Droffner (66) estudaram em diferentes linhagens

de Salmonella typhimurium (linhagem selvagem, mutante aeróbio estrito e mutante anaeróbio estrito) o efeito do oxigênio sobre os níveis de DNA-girase, topoisomerase I, catalase e de superóxido dismutase. Os níveis de DNA-girase eram muito baixos quando a linhagem selvagem era submetida a aerobiose, ou quando esta atividade era dosada em mutantes aeróbios estritos. Quando a linhagem selvagem era submetida a crescimento anaeróbico, a atividade de topoisomerase I não era encontrada e a atividade de DNA-girase era normal. Observações idênticas foram obtidas para as mutantes anaeróbicas estritas. Os autores sugerem que as atividades das enzimas topoisomerase I e DNA-girase são necessárias para a expressão de genes responsáveis pela adaptação ao crescimento em anaerobiose e aerobiose.

Oxigênio e amônia regulam a síntese do complexo nitrogenase em bactérias fixadoras de nitrogênio, aeróbicas e anaeróbicas facultativas. Na bactéria anaeróbica facultativa Klebsiella pneumoniae os genes envolvidos na regulação da síntese do complexo são os genes nifL e nifA. Enquanto o produto do gene nifA ativa a transcrição de todos os outros genes nif, o produto do nifL bloqueia a ação do produto do nifA na presença de oxigênio ou amônia (06). De acordo com Hill et al. (31), os genes estruturais da nitrogenase (operon nifHDK) são mais sensíveis a repressão por oxigênio do que os genes nifA e nifL.

Verificou-se que nas bactérias anaeróbicas, Streptococcus mutans e S. sanguis, o oxigênio aumentava a produção de ácido acético e fórmico, possivelmente por afetar a síntese de enzimas como piruvato oxidase, NADH-oxidase e NADH-peroxidase (04).

Pseudomonas aeruginosa, uma bactéria desnitrificante, tem seu consumo de nitrato prejudicado por oxigênio. O efeito inibitório na respiração de nitrato por oxigênio é imediato e reversível. Desde que a respiração aeróbica do ponto de vista energético

é mais rendosa do que a anaeróbica, um mecanismo de controle no consumo de nitrato, conforme as tensões de oxigênio, representa vantagens econômicas para a bactéria (30).

Em Aspergillus nidulans a síntese da timina-7-hidroxilase é reprimida por nitrogênio e oxigênio. A síntese desta enzima é controlada pelo gene areA, que é similar ao gene nit-2 de N.cras-sa (11, 61). Acreditando-se assim, que a expressão do gene areA possa mediar também a repressão por oxigênio (53, 54). Em Neurospora crassa a síntese de timina-7-hidroxilase também sofre repressão por amônio (27).

Os níveis de galactose-oxidase intra e extracelular de D. dendroides sofreram aumentos significativos quando o fungo foi submetido a tensões variáveis de oxigênio (zero a 100 %). Os níveis de catalase e superóxido dismutase também sofreram um incremento positivo nestas condições (45).

Em Mycobacterium phlei o oxigênio induz a síntese de enzimas respiratórias, observando-se atividades 2 a 20 vezes maiores do que as observadas em anaerobiose (24).

Dactylium dendroides crescido em meio contendo n-butilamina como única fonte de carbono e nitrogênio apresentou níveis de amino oxidase 186 vezes maior do que quando o fungo foi crescido em meio contendo íons amônio como fonte de nitrogênio. O aumento da concentração de oxigênio na fase gasosa aumentou a síntese de amino-oxidase somente com a presença do indutor, n-butilamina. O efeito era também observado na presença de repressor portanto, a síntese de amino oxidase é regulada por repressão, por metabólitos do nitrogênio e por um sistema específico de indução. O efeito do oxigênio sobre a síntese de amino oxidase não foi observado em presença de inibidor de síntese protéica, indicando que o oxigênio estaria afetando a síntese "de novo" da enzima (07).

Os níveis de mRNA do gene pet494, gene regulatório da ex-

pressão da enzima citocromo "c" oxidase de Saccharomyces cerevisiae não sofrem variação com aumentos na tensão de oxigênio. Já os níveis de atividade desta enzima são cinco vezes maiores em aerobiose do que em anaerobiose, isto sugere que a regulação por oxigênio ocorra a nível de tradução do produto deste gene (40).

Portanto, em microrganismos, o oxigênio parece estar afetando a síntese de enzimas do metabolismo de maneira distinta. No caso de Aspergillus nidulans, o oxigênio reprime a síntese da di-oxigenase timina-7-hidroxilase (54), enquanto que, em Saccharomyces cerevisiae (40), e Dactylium dendroides (07) provoca a indução de oxidases. A repressão em A.nidulans (53) parece estar associada ao gene regulador areA; já, em S.cerevisiae a indução está associada com a tradução do gene pet494 (40), também regulador, e em D.dendroides (07), a indução da amino oxidase parece ter relação tanto com a transcrição, quanto com a tradução de genes específicos ou regulatórios.

### 1.1 OBJETIVOS DO TRABALHO

As evidências sugerem um papel do oxigênio na indução da síntese de enzimas pelos vários microrganismos. Esta biossíntese pode estar relacionada ou não com a proteção do microrganismo frente a toxicidade do oxigênio, ou com uma maneira de melhor aproveitar certos nutrientes.

Com a intenção de elucidar o papel do oxigênio na síntese de enzimas do metabolismo nitrogenado, propõe-se estudar o efeito de diferentes tensões de oxigênio sobre a expressão das enzimas oxidativas reguladas por nitrogênio, a L-aminoácido oxidase e a urato-oxidase, sob condições de indução (aminoácidos ou ácido úrico) e repressão por nitrogênio (íons amônio) no fungo Neurospo-

ra crassa. Com este intuito, além da linhagem selvagem, o estudo será realizado em linhagens mutantes em genes regulatórios do circuito do metabolismo do nitrogênio ( nit-2, nit-4, gln-1b, en(am)1 e nmr-1 (alelos V2M304 e MS5)).

## 1.2 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ENZIMAS DO METABOLISMO NITROGENADO EM Neurospora crassa.

Neurospora crassa apresenta um conjunto de genes regulatórios para o controle da expressão dos genes estruturais de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio (41). Sob condições de limitação das fontes preferenciais de nitrogênio ( amônio, glutamato ou glutamina), e em presença de fontes alternativas deste elemento ( nitrato, purinas, aminoácidos e outras) enzimas responsáveis pela utilização destas fontes podem ser expressas através da participação deste controle genético ( 13,14,20,21,22,23,41,43,51, 60).

O gene nit-2 de N.crassa, um gene regulatório, tem papel central no controle da expressão de enzimas do metabolismo nitrogenado. Ele codifica uma proteína de 21.900 Daltons (20, 28, 57 ) responsável pela ativação dos promotores dos genes estruturais de diversas enzimas do metabolismo nitrogenado, como a L-aminoácido oxidase (52, 47), urato oxidase (60), histidase (14), nitrato e nitrito redutase (14, 47). A glutamina é sugerida como o efetor chave da repressão por amônio, promovendo a transformação da forma ativa da proteína NIT-2 para sua forma inativa, impedindo, a ativação dos genes estruturais das enzimas alternativas para o uso do nitrogênio (22, 23, 28, 41,61). o gene gln-1 (alelos a ou b) deste fungo é responsável pela expressão da enzima glutamina sintetase. Mutantes neste locus não sofrem repressão por amônio

ou glutamato para as enzimas alternativas do metabolismo nitrogenado (17,22).

Além da participação do gene nit-2 para a expressão das enzimas do metabolismo nitrogenado, outros genes específicos para a indução por determinados substratos são necessários. Assim, o gene nit-4 está relacionado com a indução das enzimas nitrato e nitrato redutase pelo nitrato (08,22,41). Mutantes nestes genes são desprovidas de tais atividades enzimáticas. Chambers e Marzluf(08) sugerem a participação de um sinal mais específico na indução da enzima L-aminoácido oxidase, possivelmente outro gene. Eles levantam a possibilidade do gene en(am)1 de fenótipo complexo fazer parte de um sistema indutor ou mesmo repressor para esta enzima.

Outro gene regulatório é conhecido em N.crassa por participar no controle genético do metabolismo nitrogenado, o gene nmr-1 (alelos V2M304 e MS5). Mutantes neste gene apresentam atividades de enzimas alternativas para o uso do nitrogênio, em condições de indução específica e de repressão por catabólitos de amônio (14,18,22,49). Fu e Marzluf (23) indicam que o gene nmr-1 não controla diretamente a transcrição do gene nit-2, mas codifica uma proteína regulatória que em presença de glutamina ligar-se-ia a proteína NIT-2 e assim promoveria a repressão das enzimas do metabolismo para o uso de fontes alternativas de nitrogênio.

A figura 1 apresenta um esquema da participação dos genes do circuito regulatório do nitrogênio em Neurospora crassa no controle das enzimas a serem estudadas.

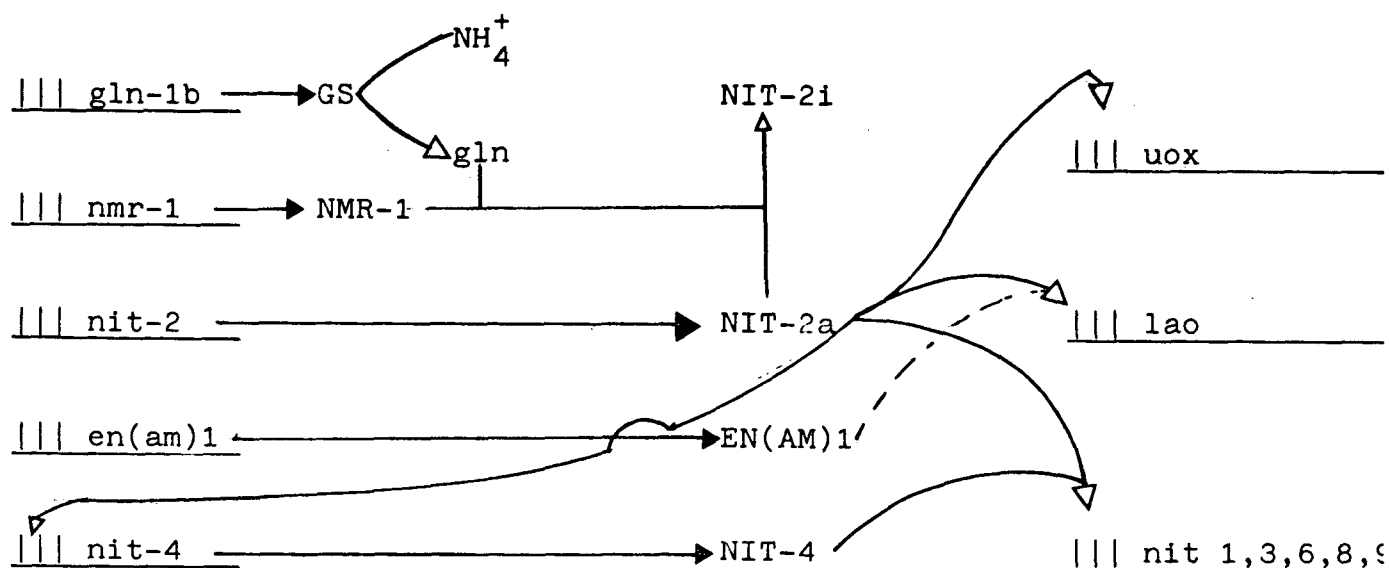


FIGURA 1 - Regulação da expressão dos genes responsáveis pela síntese das enzimas do metabolismo nitrogenado em Neurospora crassa

GS- enzima glutamina sintetase; gln- glutamina; NIT-2i- proteína NIT-2 em sua forma inativa; NIT-2a- proteína NIT-2 em sua forma ativa; uox- gene estrutural para a enzima urato-oxidase; lao- gene estrutural para a enzima L-aminoácido oxidase; nit 1,3,6,8,9,- genes responsáveis pelas enzimas nitrato e nitrito redutase; os demais símbolos correspondem aos genes (letras minúsculas) e seus produtos (letras maiúsculas) descritos no texto.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. REAGENTES

Ácido glutâmico, albumina bovina, catalase de fígado bovino duas vezes cristalizada, L-glutamina e L-leucina foram obtidas da Sigma Chemical Company. Oxigênio e nitrogênio eram provenientes da White Martins. Ácido úrico foi obtido da Mann Research Laboratories. O 2,4 dinitrofluorbenzeno foi gentilmente fornecido pelo prof. Dr. Hérrnan Chaimovich do Departamento de Bioquímica da USP.

As demais substâncias utilizadas eram da Merck A.G. Darmstadt e pró-análise.

### 2.2. MICRORGANISMO

Neurospora crassa, linhagem selvagem 74-OR-23-1A (FGSC 987 A), linhagem mutante nit-2 (FGSC 2698) e linhagem mutante nit-4 (FGSC 2993) foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Héctor Terensi do Departamento de Biologia da F.F.C.L.R.P. de Ribeirão Preto, SP.

As linhagens mutantes nmr-1 (alelos V2M304 e MS5), gln-1b (FGSC 4536) e en(am)1 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. George A. Marzluf do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Ohio, E.U.A.

### 2.3. MEIO DE CULTIVO

### 2.3.1. Meio N de Vogel

Para o cultivo do fungo utilizou-se o meio descrito por Vogel (59) com a seguinte composição:

Citrato trisódico bihidratado	3,00 g.
Fosfato monobásico de potássio	5,00 g.
Nitrato de amônio	2,00 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,20 g
Cloreto de cálcio bihidratado	0,10 g
Solução de biotina	0,10 ml
Solução de oligoelementos	0,10 ml.
Água destilada q.s.p.	1000 ml.

O meio apresentava pH final de 5,8 e era esterilizado por autoclavação a uma atmosfera de pressão por 20 minutos.

A solução de oligoelementos apresentava a seguinte composição:

Ácido cítrico monohidratado	5,00 g
Sulfato de zinco heptahidratado	5,00 g.
Sulfato de ferro amoniacal hexahidratado	1,00 g
Sulfato de cobre pentahidratado	0,25 g
Sulfato de manganês monohidratado	0,05 g
Ácido bórico	0,05 g
Molibdato de sódio trihidratado	0,05 g.
Água destilada q.s.p.	100 ml

A solução de biotina apresentava a concentração de 5 mg % em etanol-água 50 % (v/v).

Como fonte de carbono e energia utilizou-se sacarose na concentração final de 2 %. A solução de sacarose foi esterilizada separadamente em vapor fluente por 30 minutos e adicionada assépticamente ao meio.

Para a obtenção de meio sólido acrescentava-se ao meio N

de Vogel agar na concentração final de 2 % durante o seu preparo.

Para o crescimento das mutantes auxotróficas gln-1b e en(am)1, o nitrato de amônio foi substituído por L-glutamina 25 mM e inositol 50 µg/ml. (17), e ácido glutâmico 25 mM (09), respectivamente.

### 2.3.2. Meio de indução

O meio de indução para as enzimas consistia do meio N de Vogel isento de nitrato de amônio. As soluções com as fontes nitrogenadas eram adicionadas assepticamente ao meio de cultivo no início de cada experimento.

Para a indução da enzima L-aminoácido oxidase foi utilizada L-leucina como fonte de nitrogênio. A solução de L-leucina era autoclavada em vapor fluente por 30 minutos e adicionada ao meio de indução na concentração final de 5 mM (52).

Para a indução da enzima urato-oxidase, ácido úrico foi utilizado como indutor, sua solução era esterilizada em vapor fluente por 30 minutos e adicionado assepticamente ao meio de indução na concentração final de 2 mM (43).

## 2.4. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E CULTIVO DE Neurospora crassa

### 2.4.1. Conservação de amostras

As amostras de Neurospora crassa eram cultivadas em meio N de Vogel sólido com a fonte nitrogenada apropriada, a 28 ° C , por 3 a 5 dias, sendo estocadas a seguir a 4 ° C. Transferências trimestrais eram feitas.

#### 2.4.2. Obtenção de conídios

Neurospora crassa era cultivada em garrafas de Roux com meio N de Vogel sólido por 10 dias em estufa a 28°C. Esterilmente adicionava-se, à garrafa, água destilada estéril. Procedia-se a homogeneização e a solução contendo os conídios era filtrada em lâ de vidro. Efetuava-se a contagem de conídios por leitura de turbidez da solução diluída.

#### 2.4.3. Contagem de conídios

A turbidez da solução contendo os conídios era medida em um espectrofotômetro Coleman Júnior tipo 6-A a 420 nm. A densidade ótica obtida era convertida em conídios/ml pela leitura em curva de calibração previamente estabelecida. A quantidade de conídios da curva de calibração foi monitorada por contagem em câmara de Neubauer.

#### 2.4.4. Condições de germinação dos conídios (crescimento)

O crescimento de N. crassa foi efetuado, em erlenmeyers de 2 litros com 400 ml. de meio N de Vogel líquido contendo sacarose 58,5 mM e a fonte nitrogenada específica, na concentração de 25 mM.  $2 \times 10^9$  conídios foram inoculados assépticamente para cada frasco contendo o meio de cultivo. O crescimento foi efetuado por 24 horas em agitador rotatório a 110 rpm., mantido a 28 °C. Uma relação 1:5 entre volume de meio e do frasco foi mantida constante em todos os cultivos e experimentos realizados durante o trabalho.

#### 2.4.5. Obtenção da suspensão de células

Os micélios eram colhidos na fase exponencial de crescimento por filtração em papel Wheaton, lavados com água destilada estéril e ressuspensos em meio de indução em concentração final de 2 g de peso úmido por 100 ml de meio livre de fonte nitrogenada.

#### 2.4.6. Indução de enzimas em células não proliferantes

##### 2.4.6.1. Meio livre de íons amônio

A diversos frascos contendo 50 ml da suspensão de células foi adicionado 2,5 ml de solução de L-leucina (100 mM) ou ácido úrico para a concentração final de 2,0 mM conforme o experimento visava o estudo da L-aminoácido oxidase ou da urato-oxidase. Como fonte de carbono e energia foi utilizada sacarose a 2% (58,5 mM). Os frascos foram vedados com rolha de borracha e a tensão de oxigênio da fase gasosa foi ajustada. A troca de gases e monitoração do oxigênio levava cerca de trinta minutos. A adição da fonte de carbono e de nitrogênio era sempre a última etapa e correspondia ao início do experimento (tempo zero). Os frascos eram então incubados a 28 °C sob agitação contínua (110 rpm) por 8 horas.

Nos respectivos tempos de incubação procedia-se a coleta de alíquotas das culturas para a determinação de peso seco. Os micélios restantes eram filtrados, lavados com água destilada e armazenados em freezer a -17 °C para posterior obtenção de extrato livre de células. Alíquotas do meio de cultivo, livre de micélio, eram congeladas a -17 °C para as determinações de pH, teor de sacarose, amins ou de ácido úrico.

#### 2.4.6.2 Meio mínimo contendo íons amônio

O procedimento era similar ao descrito anteriormente apenas, nitrato de amônio na concentração de 0,5 mM foi acrescentado ao meio de indução, no caso da L-aminoácido oxidase e de 2,5 mM para a urato-oxidase. O teor de amônio foi determinado nas alíquotas colhidas do meio de cultivo.

As concentrações acima indicadas de íons amônio foram estabelecidas através de curva de concentração do referido repressor, com tempo de incubação de 6 horas para a L-aminoácido oxidase e 8 horas para a urato-oxidase.

#### 2.4.7 Ajuste da tensão de oxigênio na fase gasosa

A concentração de oxigênio era monitorada por cromatografia gasosa, de acordo com Pedrosa e Zancan (45), utilizando-se o Cromatógrafo Varian 1240 com detector de condutividade térmica, com coluna molecular Sieve 5A(MS-5A), de 3 pés por 1,8 polegadas, tendo argônio como gás de arraste num fluxo de 25 ml/min. A temperatura do injetor e da coluna era de 70 °C, e do detector 120 °C.

A concentração de oxigênio na fase gasosa era calculada por comparação com a altura do pico dos padrões utilizados (oxigênio puro e ar atmosférico).

### 2.5. DETERMINAÇÃO DA MASSA MICELIAL

A determinação de peso seco do micélio foi utilizada para medir a variação da massa micelial. Dez (10) mililitros do meio

de cultivo eram filtrados através de papel Wheaton de peso conhecido, adaptado a aparelho de filtração Milipore. O papel de filtro contendo o micélio era seco em estufa a 60 °C até peso constante. Por diferença calculava-se os pesos secos dos micélios.

## 2.6. PREPARO DE EXTRATOS LIVRE DE CÉLULAS

### 2.6.1. Para a enzima L-aminoácido oxidase

O procedimento descrito a seguir é o descrito por Sikora e Marzluf (52) com algumas modificações. A precipitação com sulfato de amônio conforme sugerido pelos autores não modificou o perfil dos experimentos optando-se por utilizar o extrato livre de células como fonte de enzimas. Ensaios preliminares foram feitos empregando-se tampão fosfato 50 mM pH 6,0, não observando-se diferença com o tampão a pH 7,5 contendo EDTA 0,5 mM.

Os micélios congelados eram triturados em gral de porcelana, em banho de gelo, com igual peso em areia de vidro previamente lavada com ácido nítrico e suspensos em dois volumes de tampão fosfato 50 mM pH 7,5 com EDTA 0,5 mM. A suspensão obtida era centrifugada a 15.780 g (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada Beckman modelo J-21B. A fração sobrenadante era dializada contra 250 volumes do mesmo tampão a 4 °C por 3 horas. O dializado era utilizado como fonte de enzima.

### 2.6.2. Para a enzima urato-oxidase

Os micélios congelados eram triturados em gral de porcelana em banho de gelo com igual peso em areia de vidro e suspen-

solos com 5 volumes de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,2. O homogenato era centrifugado a 15.780 g (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Os ensaios enzimáticos eram feitos com a solução sobrenadante (60).

Para a determinação do teor de proteínas a solução sobrenadante era dializada contra 250 volumes do mesmo tampão a 4°C por 3 horas.

### 2.6.3. Para a determinação dos níveis internos de amônio e aminas

O procedimento era similar aos detritos nos itens 2.6.2 e 2.6.1 variando conforme o tipo de experimento, e substituindo a solução tampão por ácido perclórico 10% (p/p). Após centrifugação o sobrenadante era neutralizado com KOH 1 N, deixado em repouso por 15 minutos e em seguida centrifugado a 7.000 rpm em centrifuga clínica por 5 minutos. As determinações eram feitas com a solução sobrenadante (50).

## 2.7. DETERMINAÇÃO DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE



A determinação da L-aminoácido oxidase foi realizada medindo-se a formação de  $\alpha$ -cetoácido em presença de catalase.

O sistema de incubação, descrito por Sikora e Marzluf(52) continha: 60  $\mu$ moles de tampão fosfato pH 7,6; 0,6  $\mu$ moles de L-leucina; 10 UI de catalase; extrato livre de células e água destilada q.s.p. 0,3 ml. O início da reação ocorria com a adição de extrato livre de células. O sistema era incubado a 37°C por tempos variáveis, acrescentando-se ao final 0,3 ml de uma solução 0,1% de 2,4-dinitrofenilhidrazina. Após 5 minutos de repouso 2,2 ml de etanol e 0,4 ml de solução 10 N de NaOH eram adicionados. A colo-

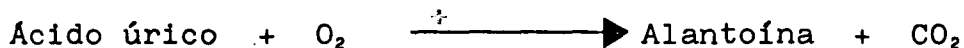
ração desenvolvida era medida a 520 nm em espectrofotômetro Beckman DU-2 utilizando uma curva tendo ácido pirúvico como padrão.

Curvas de concentração de enzima foram feitas para cada amostra analisada. Controles sem extrato livre de células e sem substratos foram realizados durante a determinação de atividade enzimática.

A unidade de L-aminoácido oxidase foi definida como a quantidade de enzima que cataliza a liberação de 1 nmol de  $\alpha$ -cetoácido por minuto. A atividade específica foi definida como a razão entre unidade de enzima e miligrama de proteína.

Em ensaios preliminares foram determinados, o pH ótimo (7,6) e o  $K_m$  (0,28 mM) e a reação era linear até 60 minutos.

## 2.8. DETERMINAÇÃO DA URATO-OXIDASE



A atividade de urato-oxidase foi monitorada pelo decréscimo de absorbância do sistema de incubação em 290 nm resultante da transformação de ácido úrico em alantoína (60).

O sistema de reação apresentava 290  $\mu$ moles de tampão Tris-HCL pH 8,6; 0,29  $\mu$ moles de ácido úrico e extrato livre de célula em um volume final de 3,0 ml. A reação era acompanhada em espectrofotômetro Beckman DU-2 com registrador.

O coeficiente de extinção do ácido úrico a 290 nm é de  $1,22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

A unidade de urato-oxidase foi definida como a quantidade de enzima que cataliza a oxidação de 1 nmol de ácido úrico por minuto. A atividade específica foi definida como a razão entre a unidade de enzima e miligrama de proteína.

Controles sem extrato livre de células e sem substrato fo-

ram realizados. A reação era linear por 20 minutos. O Km previamente determinado foi 0,012 mM e o pH ótimo de 8,6. Para cada ensaio foi realizada uma curva de concentração de enzima.

## 2.9. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram dosadas pelo método proposto por Lowry e colaboradores (39), utilizando-se como padrão a soroalbumina bovina.

## 2.10. DETERMINAÇÃO DE SACAROSE NO MEIO DE CULTIVO

Consumo da fonte de carbono e energia foi monitorado através da determinação de sacarose residual no meio de cultivo pelo método do fenol-sulfúrico (16) utilizando a própria sacarose como padrão.

## 2.11. DETERMINAÇÃO DE AMINAS

As concentrações de amina residual no meio de cultivo e interna dos micélios, foram determinadas pela técnica do 2,4-dinitrofluorobenzéno proposto por Dubin (15), tendo como padrão L-leucina.

## 2.12. DETERMINAÇÃO DE AMÔNIO

Os níveis de íons amônio presentes nos micélios e os rema

nescentes nos meios de cultivo foram determinados pela técnica do indol-fenol modificado por Chaney e Marbach (10), utilizando - se nitrato de amônio como padrão.

### 2.13. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO NO MEIO DE CULTIVO

O ácido úrico presente no meio de cultivo era monitorado utilizando-se seu coeficiente de extinção a 290 nm de  $1,22 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Alíquotas do meio eram diluídas em tampão Tris-HCl pH 8,6 50 mM, e sua densidade ótica a 290 nm era determinada. Controles com meio de cultivo isento de ácido úrico foram realizados , não observando-se interferências nas determinações.

### 2.14. DETERMINAÇÃO DE PEROXIDASE NOS EXTRATOS LIVRES DE CÉLULAS

A determinação de atividade de peroxidase foi feita pelo método de Aisaka e Terada (01); utilizando-se peróxido de hidrogênio como substrato. O sistema apresentava: 50  $\mu\text{moles}$  de tampão fosfato pH 7,0 ; 1,2  $\mu\text{moles}$  de 4-aminoantipirina; 21  $\mu\text{moles}$  de fenol; 3,6  $\mu\text{moles}$  de peróxido de hidrogênio; extrato livre de células ou meio de cultivo e completado para um volume de 3,0 ml. com água destilada. O sistema era incubado a 30°C e após 15 minutos a coloração desenvolvida era medida a 500 nm em espectrofotômetro Beckman DU-2.

### 2.15. DETERMINAÇÃO DO pH DO MEIO DE CULTIVO

O pH final do meio de cultivo livre de micélio, de todas

as amostras, foi medido em potenciômetro Metrohm Herisau E 520.

#### 2.16. DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS NO MEIO DE CULTIVO

As atividades de L-aminoácido oxidase e urato-oxidase foram determinadas nos meios de cultivo de todas as amostras conforme descrito anteriormente (itens 2.8 e 2.7).

#### 2.17. NÚMERO DE EXPERIMENTOS REALIZADOS

Cada experimento foi realizado em duplicata e os resultados correspondem à média de diferentes experimentos realizados. O número de experimentos é indicado na legenda das figuras e simbolizado por n.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. ESTUDOS COM A LINHAGEM SELVAGEM

##### 3.1.1. Cinética de indução

A linhagem selvagem de Neurospora crassa, crescida em meio de Vogel que contém íons amônio na concentração de 25 mM, apresenta níveis não detectáveis da L-aminoácido oxidase. Quando os micélios foram colocados por 6 horas em meio isento de fonte nitrogenada, os níveis de atividade enzimática foram de  $0,274 \pm 0,025$  nmoles  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . A adição de L-leucina ao meio resultou em um aumento de 38 vezes nos níveis de enzima. Os dados da figura 02 mostram que os níveis de indução da enzima eram 2,2 vezes superiores quando os micélios foram expostos a 0,8 atm de oxigênio. No decorrer do experimento não houve variação significativa na massa micelial. O consumo de L-leucina e de oxigênio aumentaram com a elevação da tensão de oxigênio na fase gasosa. As células expostas a tensão de 0,2 atm de oxigênio consumiram 32% a mais de sacarose do que aquelas submetidas a 0,8 atm em função da variação de massa micelial. A retirada de sacarose do meio não alterou os níveis basais de enzima em ambas as tensões de oxigênio. Nas condições de ensaio não houve variação significativa no pH dos meios de cultivo. Não foi detectada, nas condições ensaiadas, a presença de atividade enzimática no meio de cultivo.

Procedeu-se à determinação de atividade de peroxidase em todos os meios de cultivo e extratos livre de células. Não sendo detectado qualquer atividade nos sistemas ensaiados.

Com a finalidade de verificar se o efeito do oxigênio era observado na síntese de outras oxidases em N. crassa, os ensaios

foram repetidos determinando-se a atividade de urato-oxidase. Esta enzima é também induzida pela presença de substrato no meio de cultivo(60). Em células incubadas por 8 horas em meio isento de nitrogênio os níveis de urato-oxidase eram de  $3,66 \pm 0,25$  nmoles  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Os dados da figura 03 mostram que os níveis de urato-oxidase aumentaram 5,2 vezes em presença do indutor a 0,2 atm. de oxigênio. Quando a tensão de oxigênio na fase gasosa foi elevada para 0,8atm os níveis da enzima duplicaram. A semelhança do que ocorreu com os experimentos anteriores, o consumo de sacarose foi 30% maior a 0,2 atm de oxigênio. O consumo de oxigênio e a variação da massa micelial apresentaram também o mesmo perfil observado no no experimento em que se mediu a indução da L-aminoácido oxidase. No caso do consumo do substrato, no entanto, o ácido úrico foi exaurido mais rapidamente em altas tensões de oxigênio do que a L-leucina no experimento anterior. A cinética de indução realizada em condições de troca gasosa com ar atmosférico mantiveram o mesmo perfil verificado com a tensão de 0,2 atm de oxigênio.

### 3.1.2. Efeito da tensão de oxigênio na expressão das enzimas

O efeito da concentração de oxigênio sobre a expressão da L-aminoácido oxidase, em células não proliferantes de N.crassa, é apresentado na figura 04. A análise dos dados demonstra que houve um aumento de 21 vezes nos níveis de atividade enzimática, quando a concentração variou de zero a 0,8 atm. Nestas condições não houve variação significativa da massa micelial. O consumo de oxigênio foi proporcional à sua concentração. O consumo de L-leucina aumentou em 20% e o de sacarose diminuiu em 30%(dados não mostrados). Na ausência de L-leucina não houve aumento nos níveis de L-aminoácido oxidase, indicando que o oxigênio por si só não atua como indutor da enzima.

### 3.1.3. Indução em presença de íons amônio

#### 3.1.3.1. Efeito da concentração de amônio

Como no caso da amino oxidase de D.dendroides o efeito do oxigênio foi observado tanto em condições de repressão quanto de desrepressão (07), ensaios foram realizados para avaliar o efeito do oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase e da urato oxidase em N.crassa, em condições de repressão.

Experimentos de indução, semelhantes aos anteriormente citados, foram realizados em presença de concentrações crescentes de íons amônio a 0,2 e 0,8 atm de oxigênio. A 0,2 atm de oxigênio, concentrações de amônio superiores a 1,0 mM provocaram a repressão da síntese da enzima conforme se pode verificar na figura 05, enquanto que a 0,8 atm de oxigênio foram necessárias concentrações 4 vezes maiores para se obter o mesmo efeito. A 0,8 atm de oxigênio em presença de 0,5 mM de amônio os níveis de atividade enzimática praticamente mantiveram os mesmos valores ( $22,85 \pm 2,23 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) obtidos com ausência de amônio, enquanto a 0,2 atm apenas 3,9 % dos valores correspondentes ( $9,78 \pm 0,74 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) foram obtidos. O consumo de amônio pelo fungo foi similar nas duas tensões de oxigênio até uma concentração de 2,5 mM de íons amônio. Acima dessa concentração observou-se a saturação do consumo pelos micélios expostos a 0,2 atm de oxigênio, enquanto nos micélios submetidos a 0,8 atm o consumo de amônio foi proporcional à sua concentração no meio. O consumo de L-leucina decresceu em função da concentração de amônio no meio em ambas tensões de oxigênio.

Experimentos similares foram realizados em condições de indução da urato-oxidase. Como se pode verificar na figura 06, houve decréscimo nos níveis de atividade enzimática a partir de

concentrações superiores a 1,5 mM de íons amônio a 0,2 atm de oxigênio, enquanto que a 0,8 atm. os níveis começaram a decrescer significativamente a concentrações superiores a 2,5 mM. O consumo de amônio apresentou perfil semelhante àquele observado quando se mediu a L-aminoácido oxidase. Quanto ao consumo de ácido úrico não houve variações com a variação da tensão de oxigênio, decrescendo o consumo em função do aumento de amônio no meio de cultivo.

### 3.1.3.2. Cinética de indução em presença de íons amônio

Para confirmar o efeito do oxigênio em condições de repressão, os ensaios de cinética de indução da L-aminoácido oxidase foram realizados em presença de 0,5 mM de íons amônio, determinando-se os níveis intra e extracelulares deste íon.

Conforme se pode observar os níveis da L-aminoácido oxidase a 0,8 atm. de oxigênio (figura 07) atingiram os mesmos níveis de indução daqueles obtidos em condições de desrepressão. No entanto a 0,2 atm. de oxigênio praticamente não houve indução da enzima, embora o indutor estivesse presente. O amônio do meio extracelular foi exaurido após 2 horas de incubação em ambas tensões de oxigênio, enquanto que os níveis de amônio intracelulares aumentaram em função do tempo e eram maiores nos micélios exposto a 0,8 atm. de oxigênio. O consumo de L-leucina foi retardado em presença de íons amônio na cultura, sendo maior a 0,8 atm. de oxigênio. Os níveis intracelulares de amins não variaram significativamente com a variação da tensão de oxigênio.

Quando os mesmos experimentos foram repetidos, medindo-se a indução da urato-oxidase em presença de 2,5 mM de íons amônio (figura 08), os níveis de atividade enzimática a 0,8 atm. de oxigênio foram semelhantes aos obtidos em condições de desrepressão. A 0,2 atm. de oxigênio, no entanto, os níveis foram 50 % inferiores.

Os níveis intracelulares de amônio foram maiores a 0,8 atm. de oxigênio, assim como, o consumo de amônio e de ácido úrico.

### 3.2. ESTUDOS COM A LINHAGEM MUTANTE nit-2

De acordo com Marzluf e colaboradores (23,28,41,57), o gene nit-2 é o principal gene regulador da expressão de enzimas do metabolismo nitrogenado em Neurospora crassa. Em Aspergillus nidulans, o gene regulador correspondente é o gene areA. Estudando a expressão da timina-7-hidroxilase e de outras enzimas do metabolismo nitrogenado, Shaffer et al. (54) observaram que o gene areA estaria envolvido tanto na repressão por metabólitos do nitrogênio como pela repressão pelo oxigênio. Para verificar a participação do gene nit-2 na expressão da L-aminoácido oxidase e da urato-oxidase em função da tensão de oxigênio, experimentos similares aos realizados com a linhagem selvagem, foram feitos com a linhagem mutante nit-2. Os dados da figura 09, mostram que a velocidade de indução foi 31vezes inferior à observada com a linhagem selvagem nas mesmas condições para a L-aminoácido oxidase. Apesar disso, o aumento da tensão de oxigênio duplicou os níveis de atividade enzimática. A L-leucina foi exaurida do meio ao mesmo tempo em ambas as condições. Os demais parâmetros fisiológicos monitorados apresentaram o mesmo perfil obtido com a linhagem selvagem.

No caso da urato oxidase o que se observou foi um aumento das atividades em ambas as tensões de oxigênio, em níveis duas vezes inferiores àqueles obtidos com a linhagem selvagem, não se observando efeito significativo do oxigênio. O consumo de ácido úrico foi idêntico em ambas as tensões de oxigênio e com uma velocidade de consumo distinta da linhagem selvagem (figura 10).

### 3.3. ESTUDOS COM A LINHAGEM MUTANTE nit-4

O gene nit-4 é também considerado um gene regulador da expressão da enzimas do metabolismo nitrogenado em N.crassa (41). No entanto, a sua participação está bem caracterizada apenas na expressão da nitrato e nitrito redutases (21).

Com a finalidade de verificar a participação do gene nit-4 na expressão da L-aminoácido oxidase e da urato-oxidase em diferentes tensões de oxigênio, os ensaios de cinética de indução em condições de repressão e desrepressão foram repetidos com a mutante nit-4, bem como o efeito do oxigênio foi estudado em ambos os casos.

Em condições de desrepressão, os níveis de L-aminoácido oxidase (figura 11) a 0,2 atm eram 82 % inferiores aos da linhagem selvagem, mantendo-se praticamente constantes durante o experimento. Em 0,8 atm de oxigênio os níveis da L-aminoácido oxidase eram 27,5 % inferiores aos da linhagem selvagem. A L-leucina foi mais rapidamente consumida por esta mutante do que pelo tipo selvagem, devido a maior massa micelial da mutante. Os demais parâmetros fisiológicos medidos apresentaram o mesmo perfil do tipo selvagem.

Quando o efeito da tensão de oxigênio foi determinado sobre os níveis da L-aminoácido oxidase (figura 12) observou-se que o efeito não é proporcional à tensão de oxigênio como ocorre com a linhagem selvagem, assim como os níveis atingidos são inferiores.

Com relação à urato-oxidase (figura 13), os níveis de atividade enzimática foram equivalentes aos da linhagem selvagem a 0,2 atm de oxigênio. Um aumento de 25% nos níveis de enzima foi observado quando os micélios da mutante nit-4 foram expostos a 0,8 atm de oxigênio.

A incubação dos micélios em meio contendo 0,5 mM de íons

amônio e L-leucina (figura 14) não afetou o perfil de indução quando comparado com o experimento semelhante em condições de desrepressão. Apenas o consumo de aminos foi alterado, aliás, como já havia sido observado com a linhagem selvagem. Os demais parâmetros fisiológicos determinados apresentaram o mesmo perfil da linhagem selvagem, quando submetida às mesmas condições.

O comportamento da mutante nit-4 com relação à expressão da urato-oxidase em presença de 2,5 mM de íons amônio é semelhante ao tipo selvagem quando submetida às mesmas condições (figura 15).

#### 3.4. ESTUDOS COM AS LINHAGENS MUTANTES gln-1b, nmr-1 (alelos Y2M304 e MS5) e en(am)1

O efeito do oxigênio sobre os níveis da L-aminoácido oxidase e da urato-oxidase poderia ser explicado pelo aumento do consumo de glutamina em altas tensões de oxigênio, reduzindo a repressão, já que se admite que a glutamina é o catabólito do metabolismo nitrogenado que participa do mecanismo de repressão (28). Para testar esta possibilidade, os ensaios foram repetidos com a mutante gln-1b que é incapaz de sintetizar a glutamina sintetase em forma ativa (46).

Os dados da figura 16 mostram o efeito do oxigênio sobre a cinética de indução da L-aminoácido oxidase na mutante gln-1b. Conforme se pode observar, os níveis de atividade enzimática são 68 % inferiores ao da linhagem selvagem a 0,2 atm de oxigênio. O efeito do oxigênio também foi observado, embora os níveis de indução fossem inferiores àqueles da linhagem selvagem nas mesmas condições.

O gene nmr-1 é o gene responsável pela regulação negativa

da expressão das enzimas do metabolismo nitrogenado (23). Outra possibilidade para explicar o efeito do oxigênio em condições de repressão seria que o produto do gene nmr-1 não estivesse disponível. Para testar esta possibilidade, mutantes defectivas no gene nmr-1 foram submetidas às mesmas condições de indução da linhagem selvagem. Conforme se pode verificar na figura 17, a velocidade de indução da L-aminoácido oxidase na mutante nmr-1 (alelo V2M304) é 2,78 vezes maior quando a tensão de oxigênio aumentou de 0,2 a 0,8 atm. Deve ser salientado que a mutante apresenta níveis de atividade enzimática altos na ausência de indutor.

Com a mutante nmr-1 (alelo MS5), figura 18, o efeito indutivo foi menor, mas ainda assim o efeito do oxigênio foi observado. Quando se variou a tensão de oxigênio (figura 19), os níveis da L-aminoácido oxidase aumentaram proporcionalmente à tensão de oxigênio, o que não ocorre quando o indutor está ausente.

De acordo com Chambers e Marzluf (08) a expressão da L-aminoácido oxidase estaria regulada pelo gene en(am)1. Por este motivo o efeito do oxigênio sobre a indução da L-aminoácido oxidase foi analisado na mutante en(am)1 em duas tensões de oxigênio. Conforme se pode verificar na figura 20, os níveis de atividade enzimática correspondentes àqueles obtidos com a linhagem selvagem a 0,2 atm. de oxigênio, apresentaram a mesma velocidade de indução. No entanto, o aumento da tensão de oxigênio não provocou aumentos nos níveis de atividade enzimática como ocorreu com a linhagem selvagem e as demais mutantes estudadas.

O efeito do oxigênio sobre a síntese da L-aminoácido oxidase em condições de repressão por 0,5 mM de amônio foi estudado em todas as mutantes, e os resultados estão apresentados na tabela II. Conforme se observa, os níveis de atividade enzimática, a 0,2 atm. de oxigênio, foram inferiores àqueles obtidos com a linhagem selvagem na ausência de íons amônio, em todas as mutantes,

exceto na mutante en(am)1. O efeito do oxigênio foi observado, tam  
bém nas mutantes gln-1b e nmr-1 (alelos V2M304 e MS5). O efeito ob-  
servado foi inferior ao verificado com a linhagem selvagem e mu-  
tante nit-4, em idênticas condições. A mutante en(am)1 não apresen-  
tou o efeito do oxigênio.

TABELA I - Efeito do oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em condições de repressão em linhagens de Neurospora crassa

LINHAGEM	ATIVIDADE ENZIMÁTICA*	
	0,2 ATM de O <sub>2</sub>	0,8 ATM de O <sub>2</sub>
Selvagem(740R231A)	10,38 ± 0,03	22,78 ± 2,20
<u>nit-4</u>	0,00 ± 0,00	16,46 ± 1,51
<u>gln-1b</u>	4,15 ± 0,33	6,83 ± 0,25
<u>en(am)1</u>	10,25 ± 0,35	11,02 ± 0,73
<u>nmr-1(V2M304)</u>	8,70 ± 0,23	11,00 ± 0,62
<u>nmr-1(MS5)</u>	4,82 ± 0,01	5,72 ± 0,30

\* Atividade está expressa em: nmoles de piruvato min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>

Tempo de incubação: 6 horas

Fontes de nitrogênio: L-leucina 5 mM

íons amônio 0,5 mM

FIGURA 02 - Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Linhagem Selvagem

Um grama de micélio crescido em meio de Vogel foi ressuspensado em 50 ml de meio de indução e submetidos a tensões de 0,2 (símbolos abertos) ou 0,8 (símbolos fechados) atm de oxigênio, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram iniciados pela adição de L-leucina 5 mM e de sacarose 58,5 mM e o material foi incubado a 28 °C por diferentes tempos. Nos tempos indicados procedeu-se a coleta das amostras para as determinações de: atividade enzimática ( $\diamond$   $\blacklozenge$ ); sacarose ( $\square$   $\blacksquare$ ); L-leucina (o  $\bullet$ ); massa micelial ( $\Delta$   $\blacktriangle$ ) e oxigênio ( $\blacktriangleleft$   $\blacklozenge$ ).

Os valores representam a média dos resultados com seus desvios (n=4).

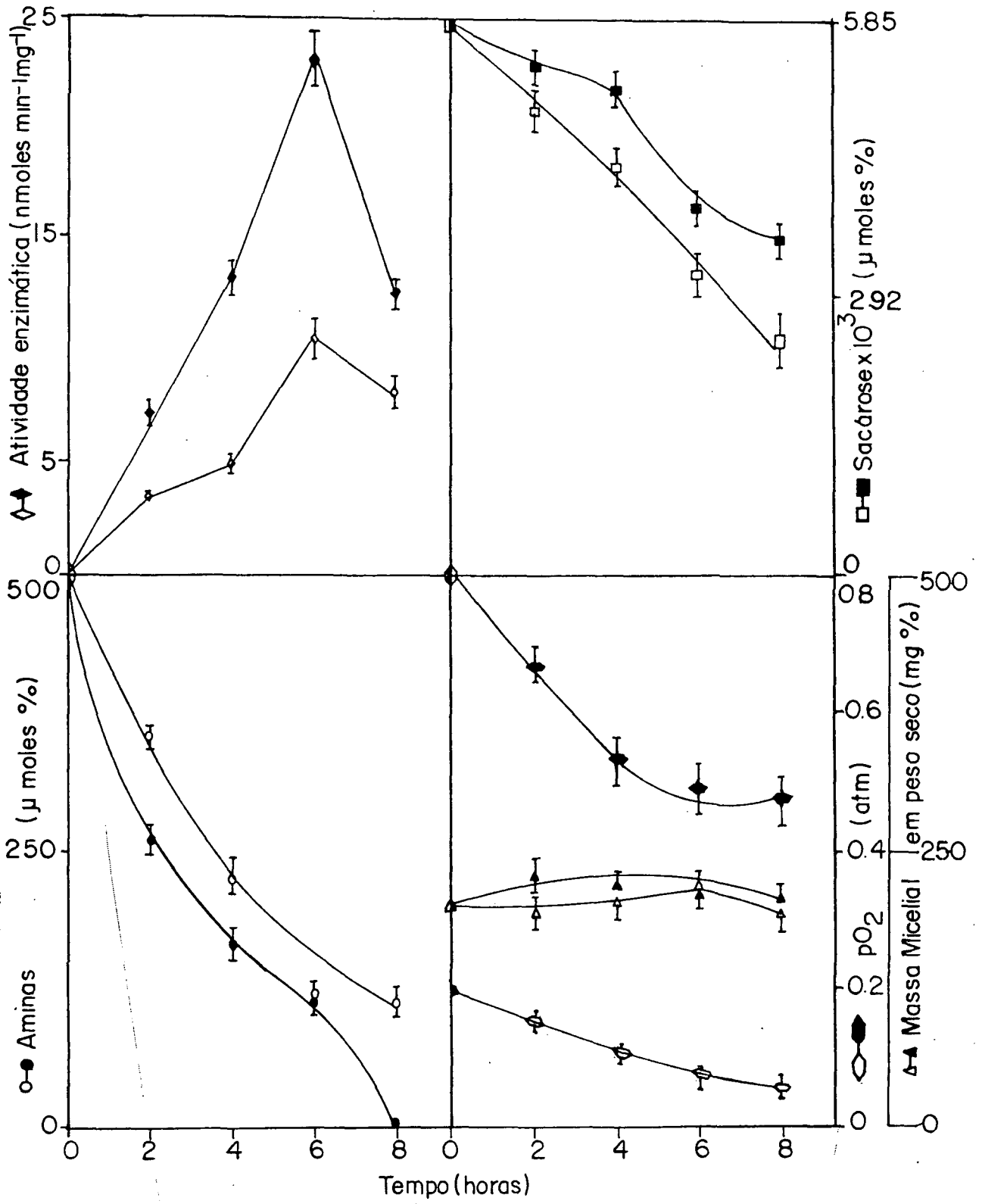


FIGURA 03 - Cinética de indução da urato-oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Linhagem selvagem

Um grama de micélio crescido em meio de Vogel foi ressuspensão em 50 ml de meio de indução e submetido a tensões de 0,2 (símbolos abertos) ou 0,8 (símbolos fechados) atm de oxigênio, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram iniciados pela adição de ácido úrico 2 mM e de sacarose 58,5mM e o material foi incubado a 28 °C por diferentes tempos. Nos tempos indicados procedeu-se a coleta das amostras para as determinações de: atividade enzimática ( $\diamond$   $\blacklozenge$ ); sacarose ( $\square$   $\blacksquare$ ); ácido úrico (o  $\bullet$ ); massa micelial ( $\Delta$   $\blacktriangle$ ) e oxigênio ( $\blacktriangleleft$   $\blacklozenge$ ). Os valores representam a média dos resultados com seus desvios (n=2).

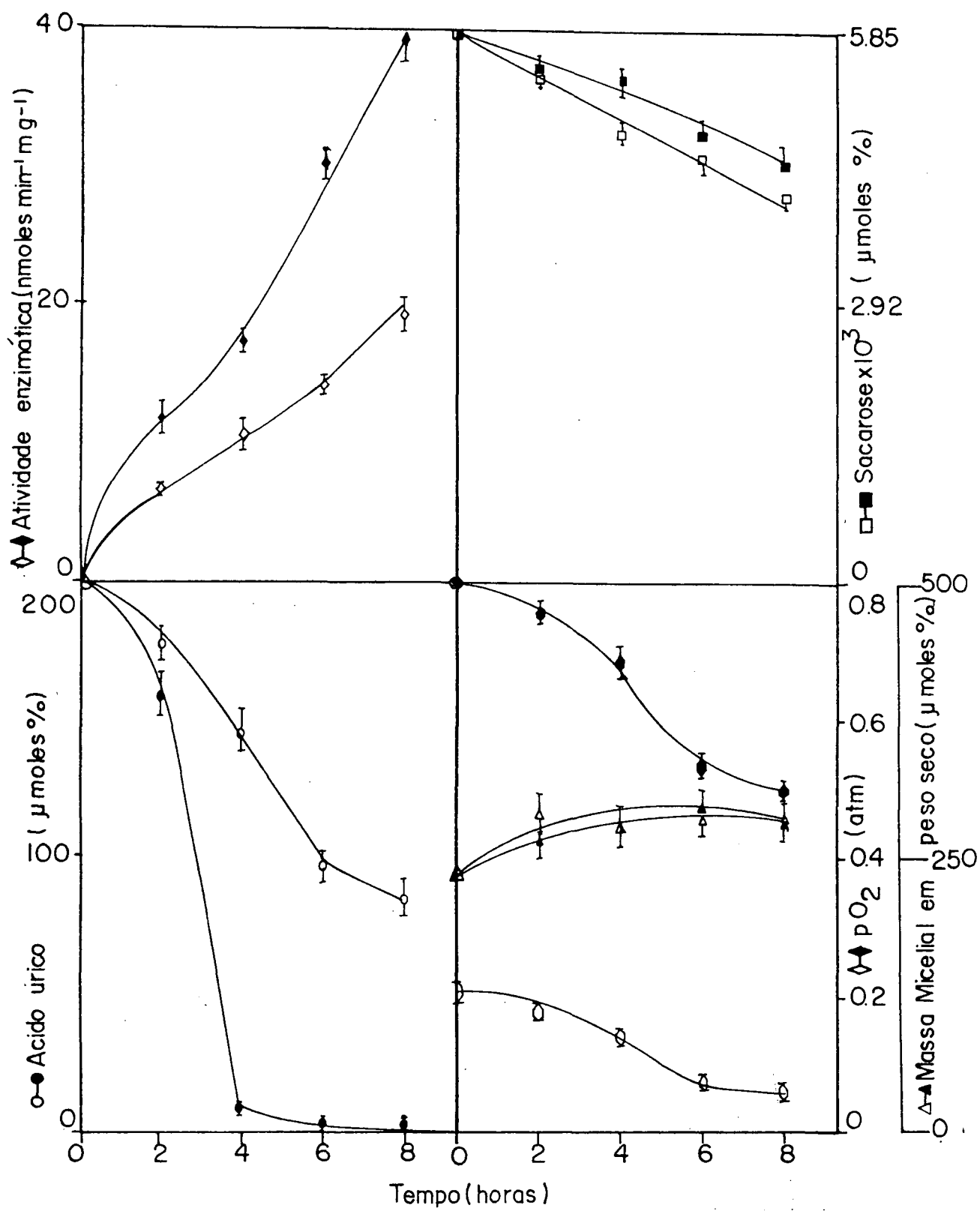


FIGURA 04 - Efeito da tensão de oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em condições de indução - Linhagem selvagem

Um grama de micélio crescido em meio de Vogel foi ressuspensa em 50 ml de meio de indução e submetido a concentrações crescentes de oxigênio ( zero a 0,8 atm) conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram iniciados pela adição de L-leucina 5mM e de sacarose 58,5 mM (símbolos abertos) ou somente sacarose 58,5 mM (símbolos fechados), e incubados a 28 °C por 6 horas, finalido o qual, coletou-se amostras para as determinações de: atividade enzimática ( $\diamond$   $\blacklozenge$ ); massa micelial ( $\Delta$ ) e oxigênio ( o ).

Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

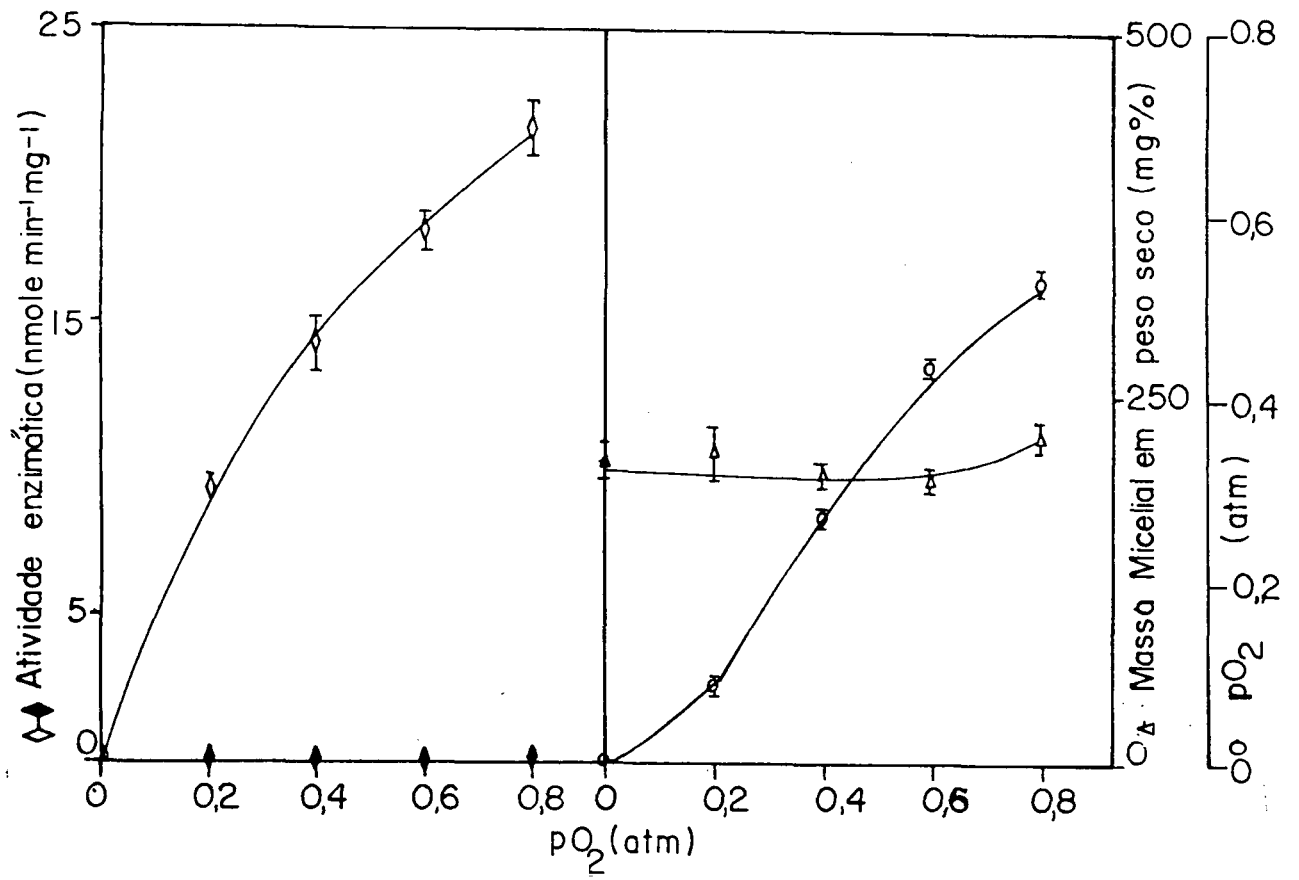


FIGURA 05 - Efeito da concentração de íons amônio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Linhagem selvagem

Células não proliferantes, obtidas conforme descrito em Materiais e Métodos foram ressuspensas em meio de indução, contendo L-leucina 5 mM e sacarose 58,5 mM e íons amônio em concentrações que variaram de zero a 5 mM, e expostos a tensões de 0,2 atm (símbolos abertos) ou 0,8 atm (símbolos fechados) de oxigênio. Após 6 horas de incubação a 28°C procedeu-se a coleta das amostras para as determinações de: atividade enzimática ( $\diamond$   $\blacklozenge$ ); amônio ( $\Delta$   $\blacktriangle$ ); aminas (o  $\bullet$ ); massa micelial ( $\square$   $\blacksquare$ ).

100% de atividade corresponde para 0,8 atm  $22,85 \pm 2,23$  e para 0,2 atm  $9,78 \pm 0,78$  nmoles de piruvato  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

Os valores representam a média de cada resultado com o seu desvio padrão (n=2) .

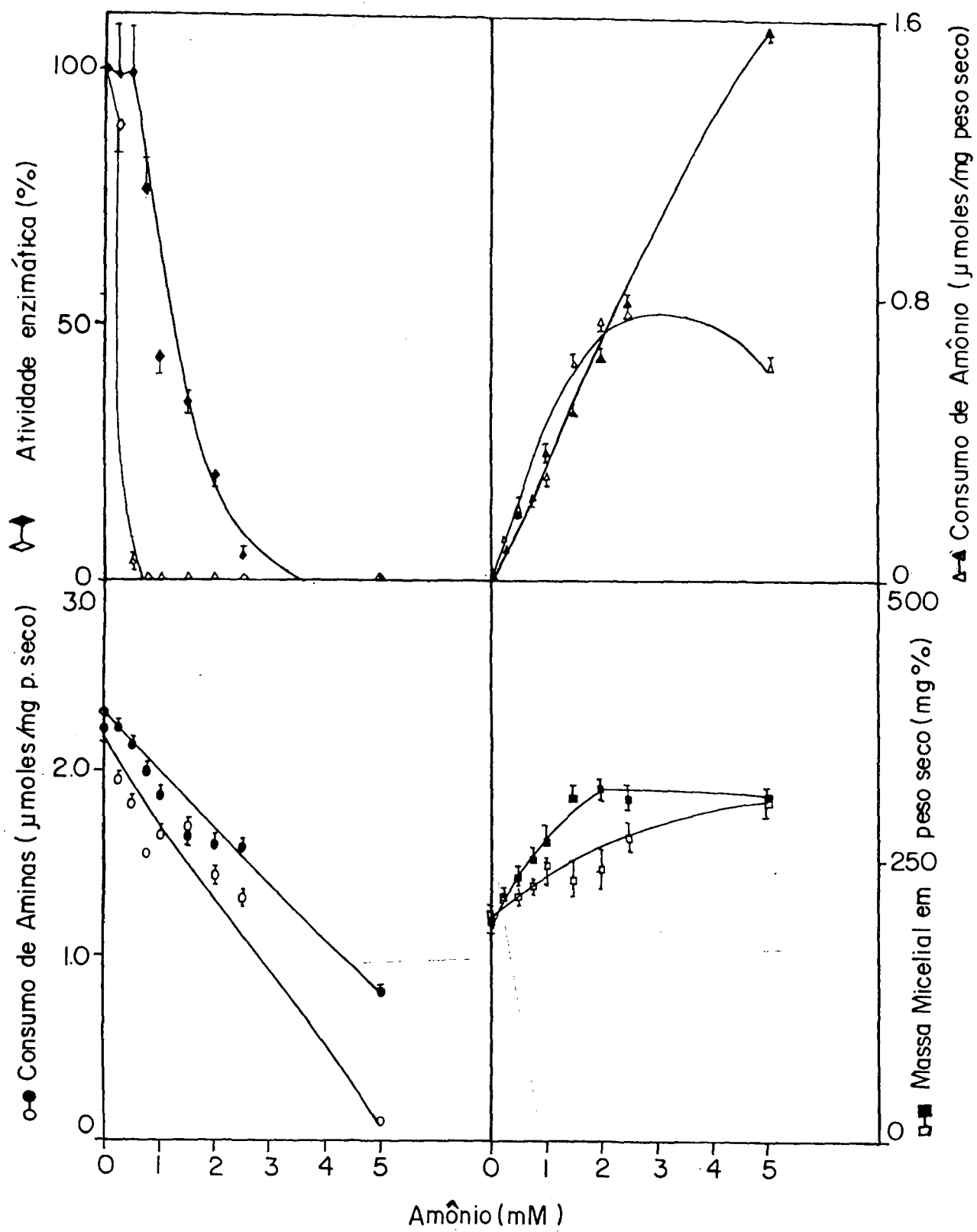


FIGURA 06 - Efeito da concentração de íons amônio sobre os níveis de urato-oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Linhagem selvagem

Células não proliferantes, obtidas conforme descrito em Materiais e Métodos, foram ressuspensas em meio de indução, contendo ácido úrico 2 mM, sacaroses 58,5 mM, e íons amônio em concentrações que variaram de zero a 5 mM, e expostos a tensões de 0,2 (símbolos abertos) e 0,8 (símbolos fechados) atm de oxigênio. Após 8 horas de incubação a 28 °C procedeu-se a coleta das amostras para as determinações de: atividade enzimática (◇ ◆); amônio (Δ ▲); ácido úrico (○ ●); massa micelia (□ ■). 100% de atividade corresponde para 0,8 atm a  $39,40 \pm 3,33$  e para 0,2 atm a  $19,10 \pm 1,75$  nmoles de ácido úrico  $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ . Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

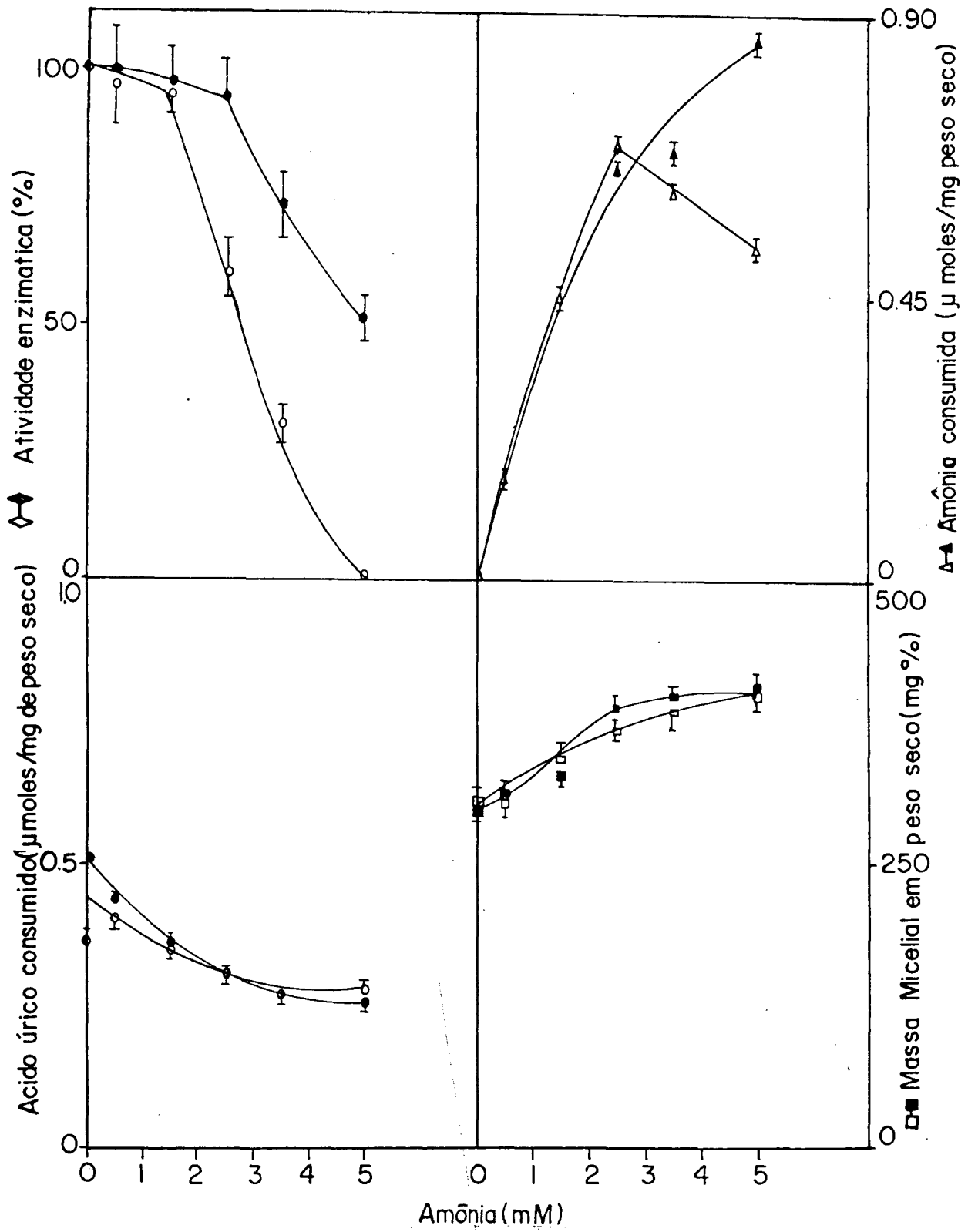


FIGURA 07 - Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio em condições de repressão - Linhagem selvagem

Um grama de micélio crescido em meio de Vogel foi ressuspensa em 50 ml de meio de indução e submetido a tensões de 0,2 (símbolos abertos) ou 0,8 (símbolos fechados) atm de oxigênio, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram iniciados pela adição de L-leucina 5 mM, sacarose 58,5 mM e íons amônio 0,5 mM. O material foi incubado a 28 °C por diferentes tempos. Nos tempos indicados procedeu-se a coleta das amostras para as determinações de: atividade enzimática ( $\diamond \blacklozenge$ ); níveis intracelulares de amins ( $\nabla \blacktriangledown$ ); amins (o  $\bullet$ ); amônio ( $\blacktriangleleft \blacktriangleright$ ) e níveis intracelulares de amônio ( $\blacklozenge \blacklozenge$ ). Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

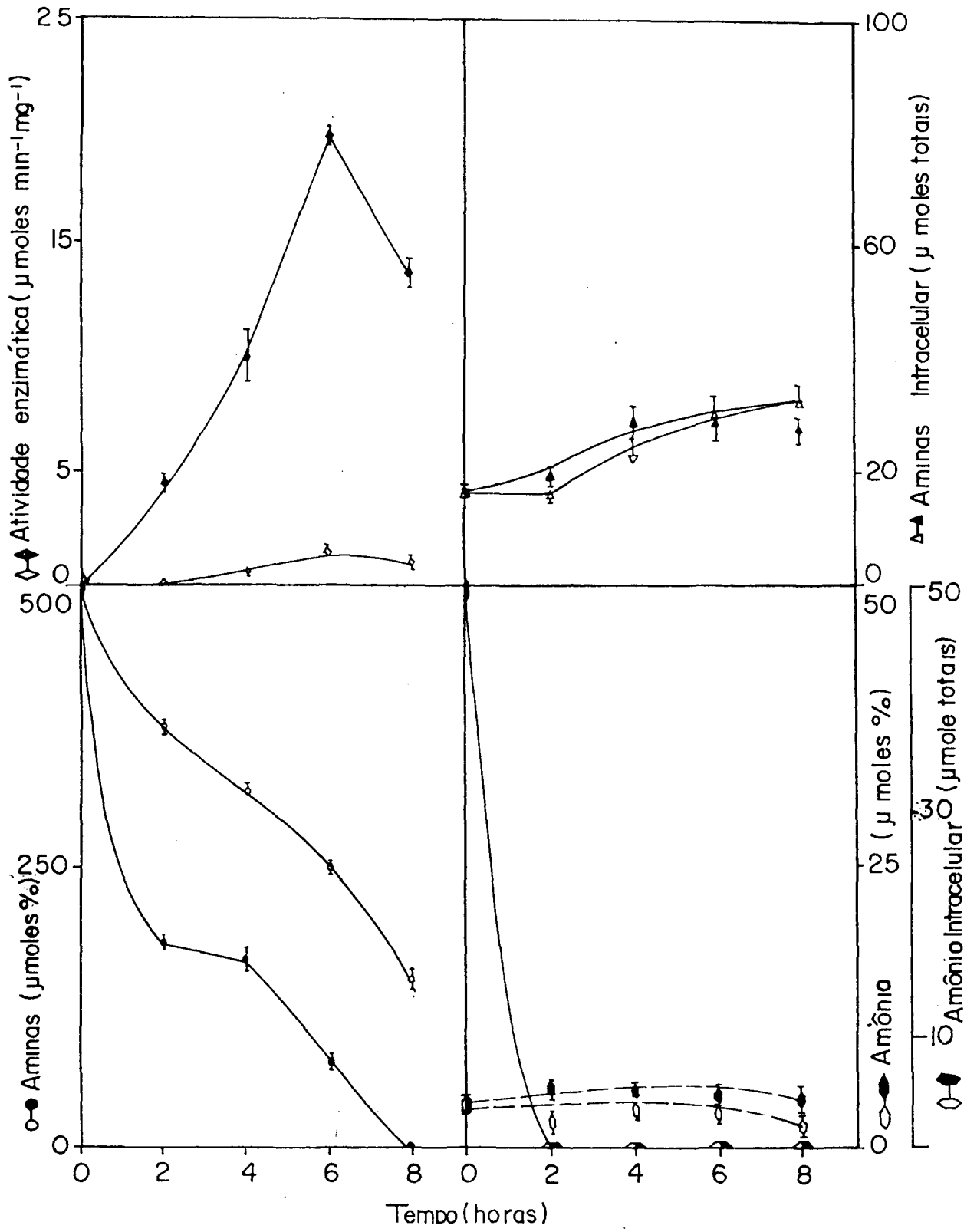
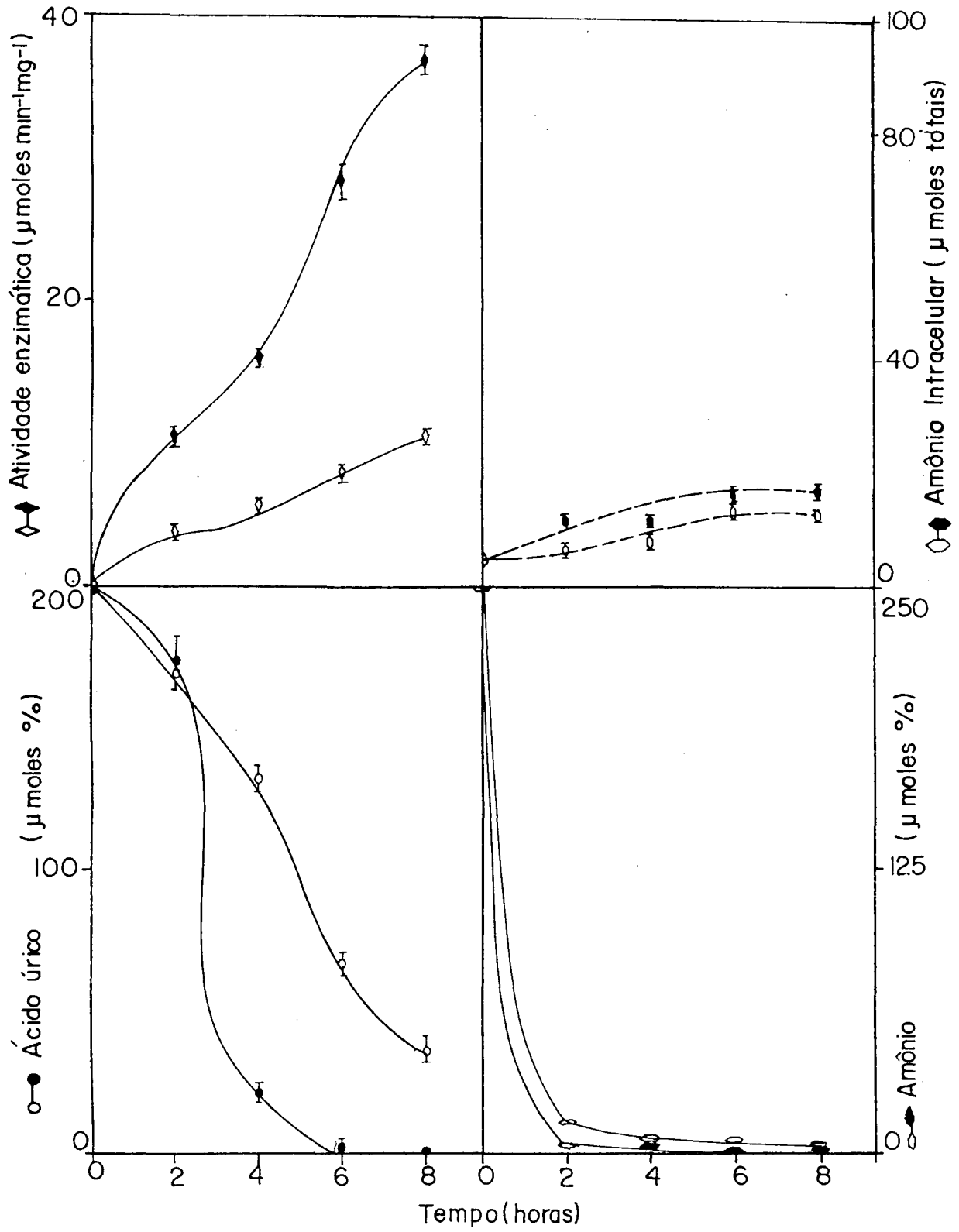


FIGURA 08 - Cinética de indução da urato-oxidase em diferentes tensões de oxigênio em condições de repressão - Linhagem selvagem

Um grama de micélio crescido em meio de Vogel foi ressuspensado em 50 ml de meio de indução e submetido a tensões de 0,2 (símbolos abertos) ou 0,8 (símbolos fechados) atm de oxigênio, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os experimentos foram iniciados pela adição de ácido úrico 2 mM, sacarose 58,5 mM e íon~~o~~ amônio 2,5 mM. O material foi incubado a 28 °C por diferentes tempos. Nos tempos indicados procedeu-se a coleta das amostras para as determinações de: atividade enzimática (◊◆) ; níveis intracelulares de amônio (◊◆); ácido úrico (◉●); amônio (◁◆). Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).



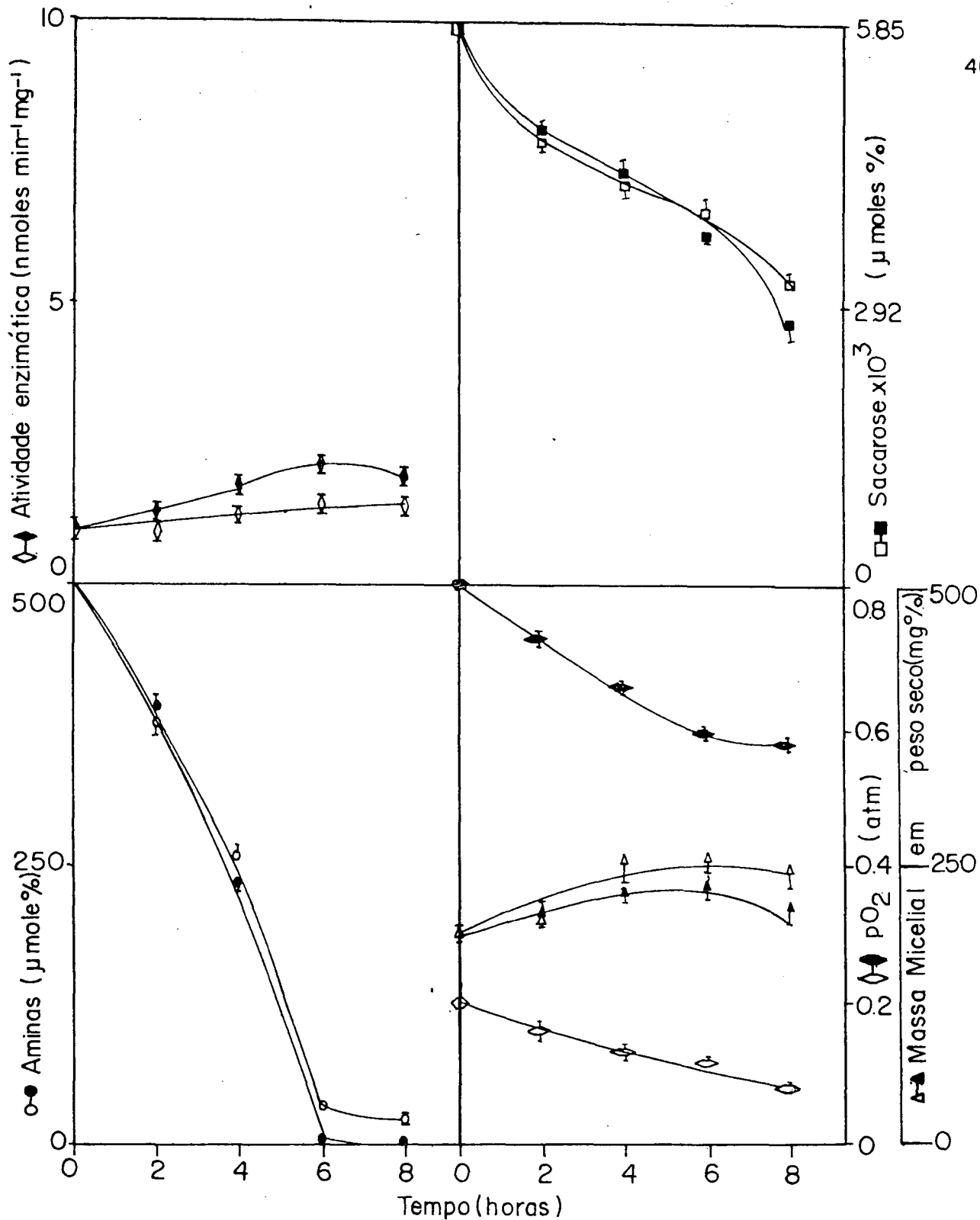


FIGURA 09 - Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Mutante *nit-2*

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 02. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

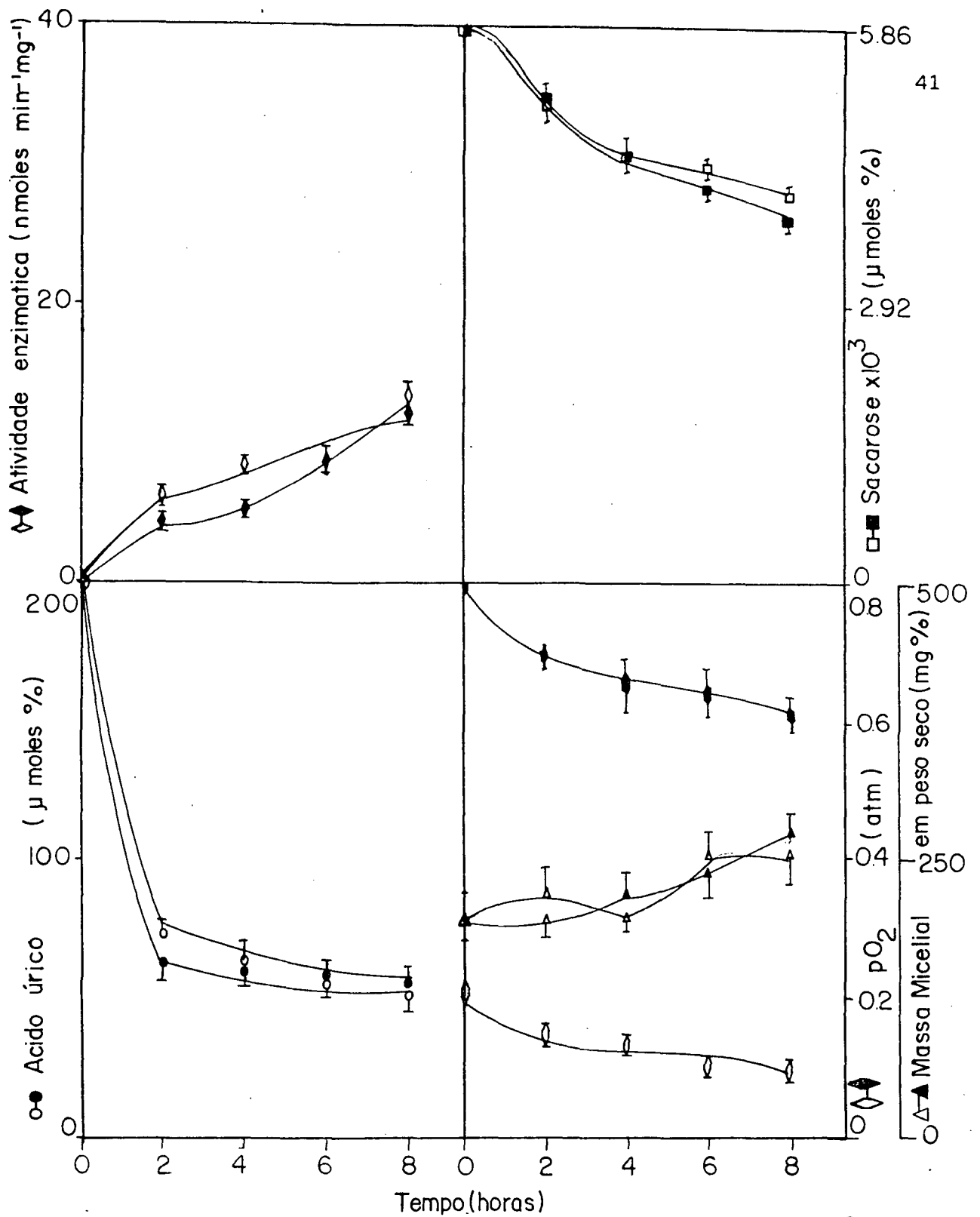


FIGURA 10 - Cinética de indução da urato-oxidase em diferentes ten-  
sões de oxigênio - Mutante nit-2

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles des-  
critos na figura 03. Os valores representam a média e o desvio pa-  
drão de cada resultado (n=2).

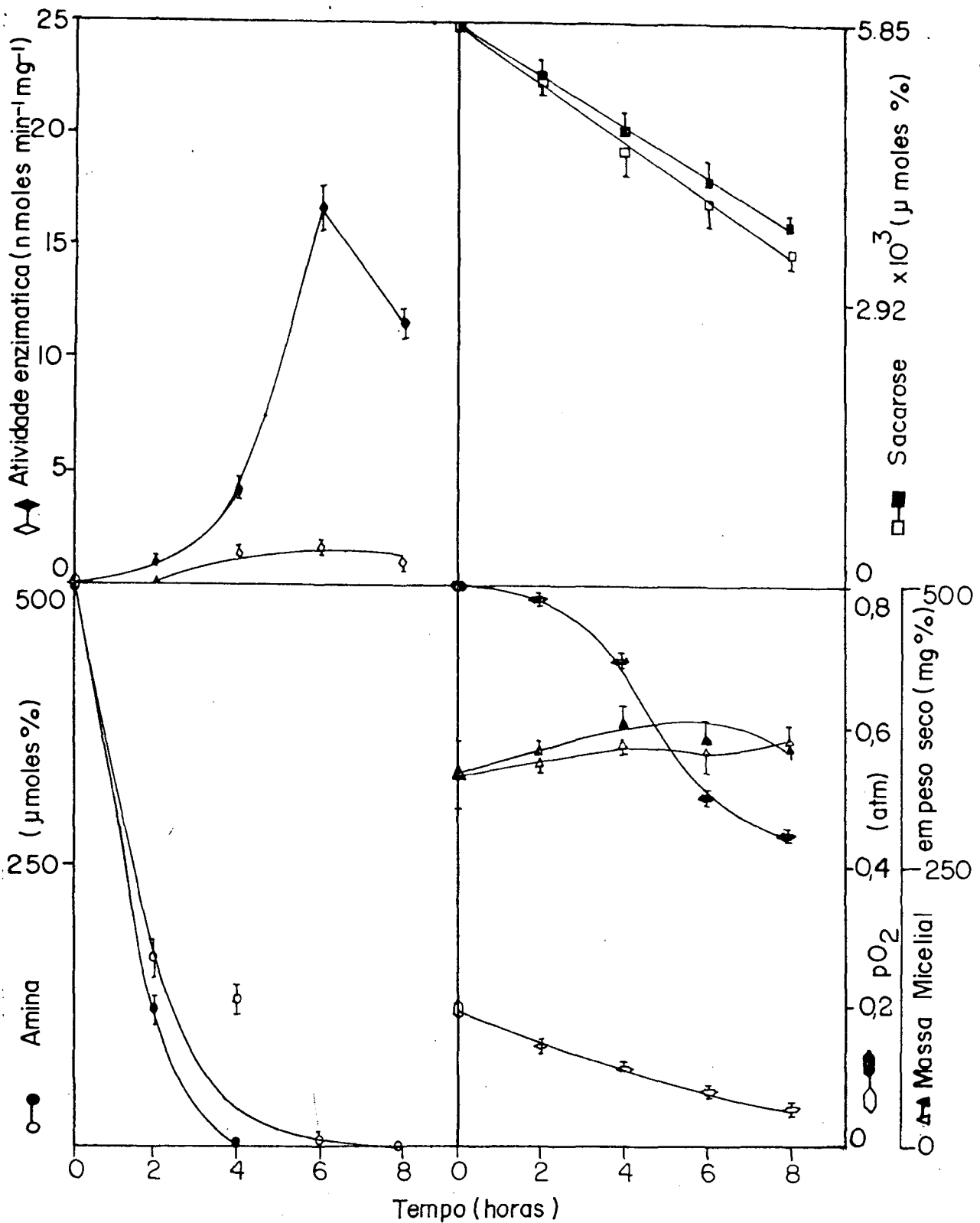


FIGURA 11 - Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio - mutante nit-4

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 02. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

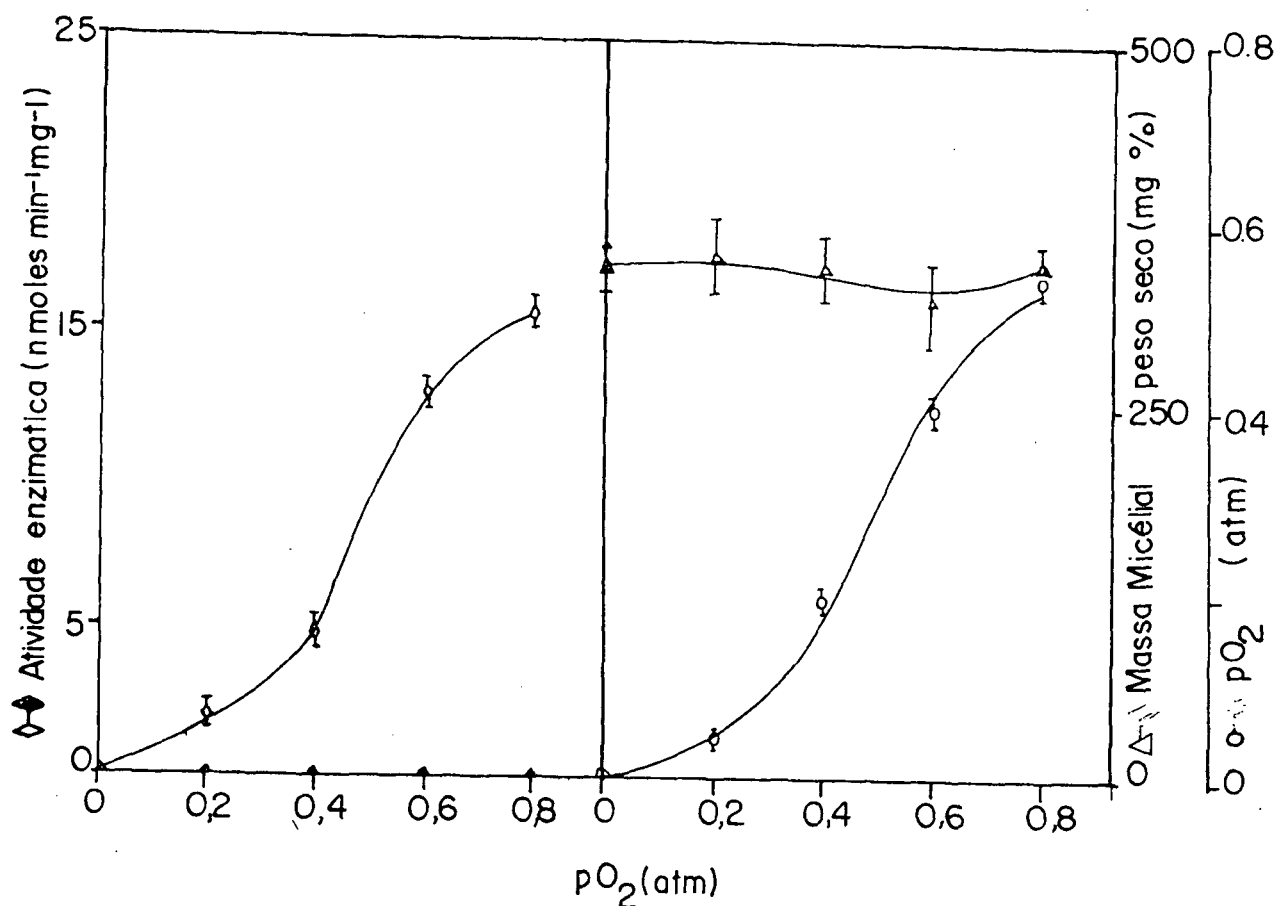


FIGURA 12 - Efeito da tensão de oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em condições de indução - Mutante nit-4

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 04. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

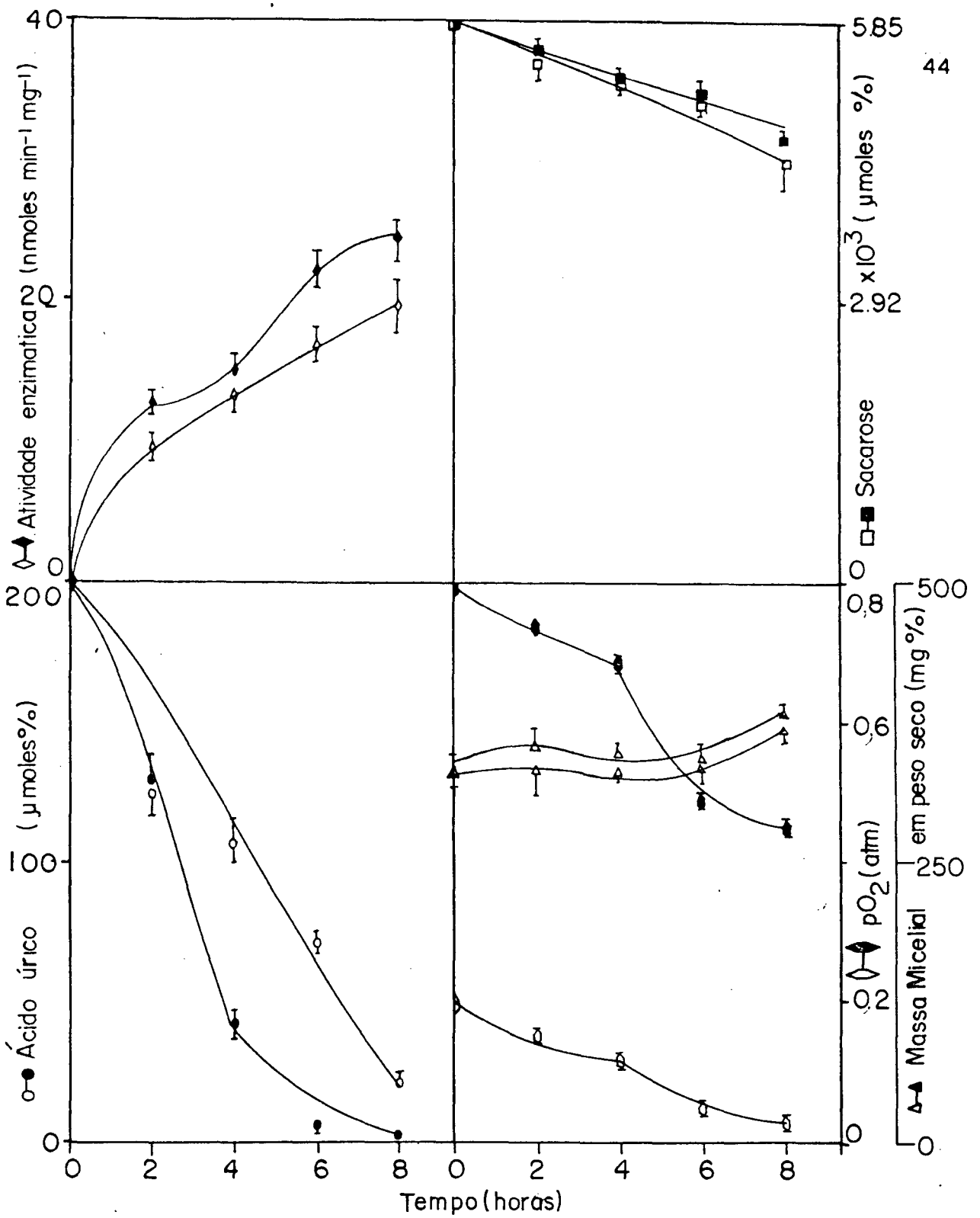


FIGURA 13 - Cinética de indução da urato-oxidase em diferentes tensões de oxigênio - mutante nit-4

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 03. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

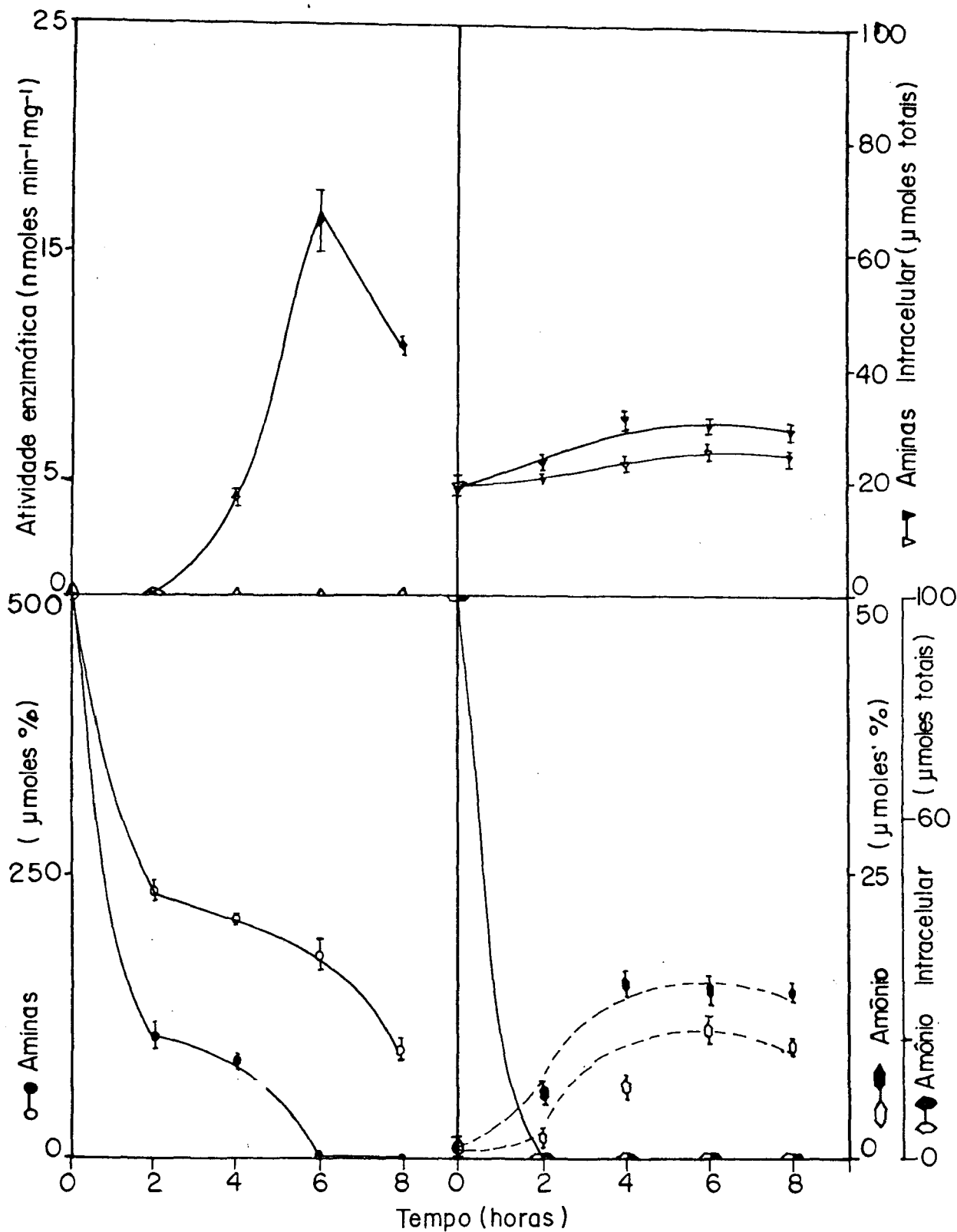


FIGURA 14 - Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio em condições de repressão - Mutante *nit-4*

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 07. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

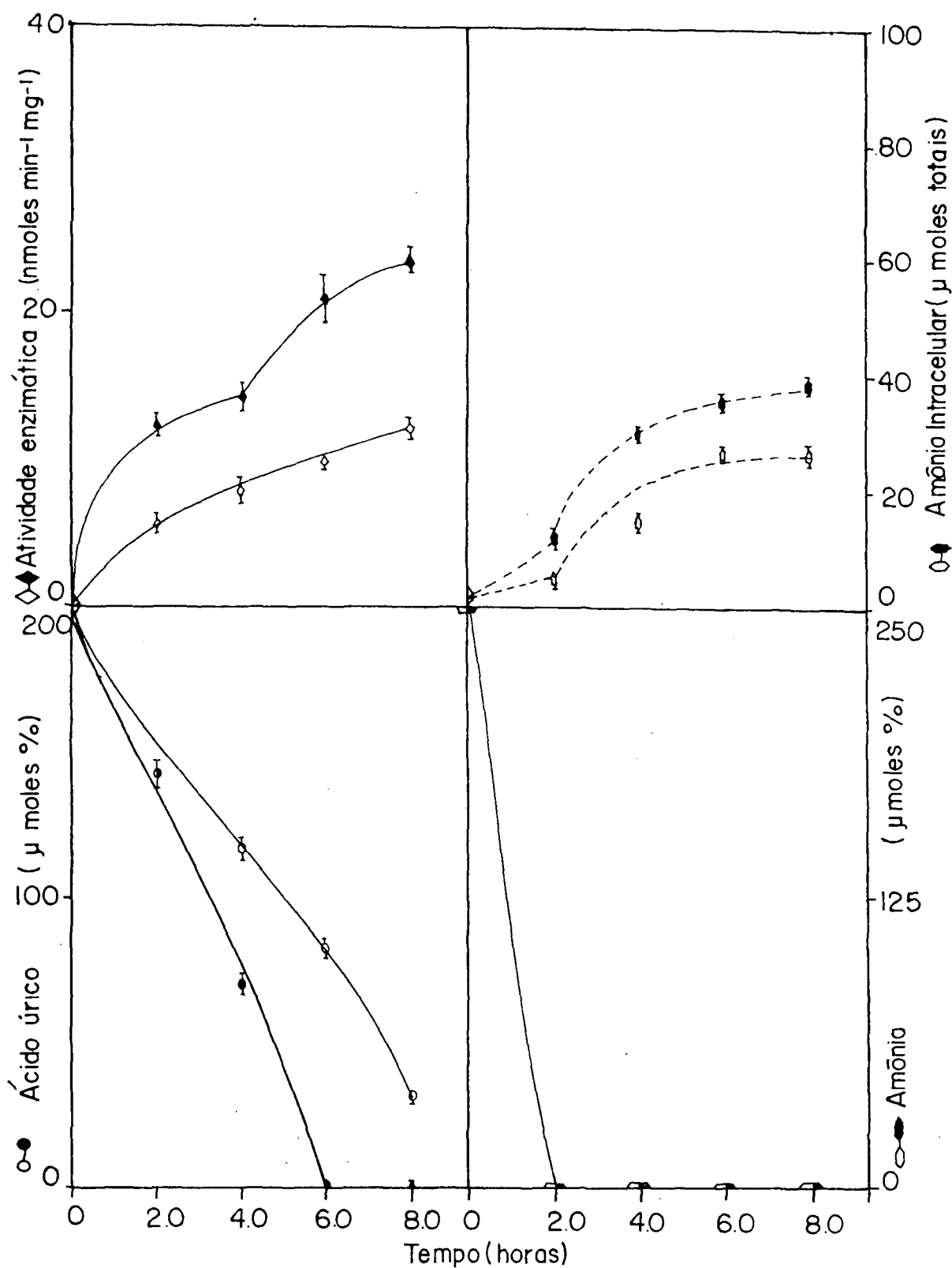


FIGURA 15 - Cinética de indução da urato-oxidase em diferentes tensões de oxigênio em condições de repressão - Mutante nit-4

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 08. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

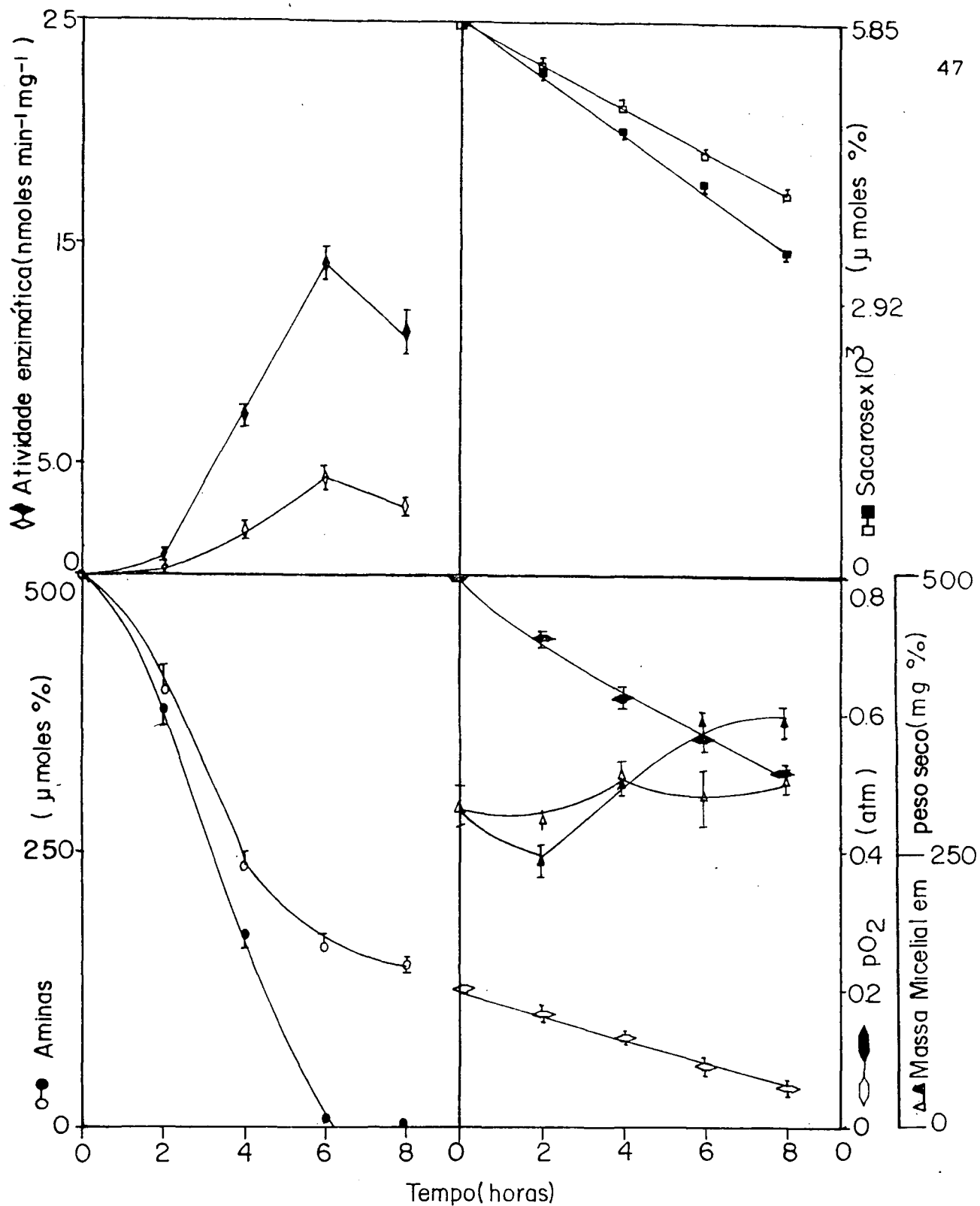


FIGURA 16 - Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes de oxigênio - Mutante *gln-1b*

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 02. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

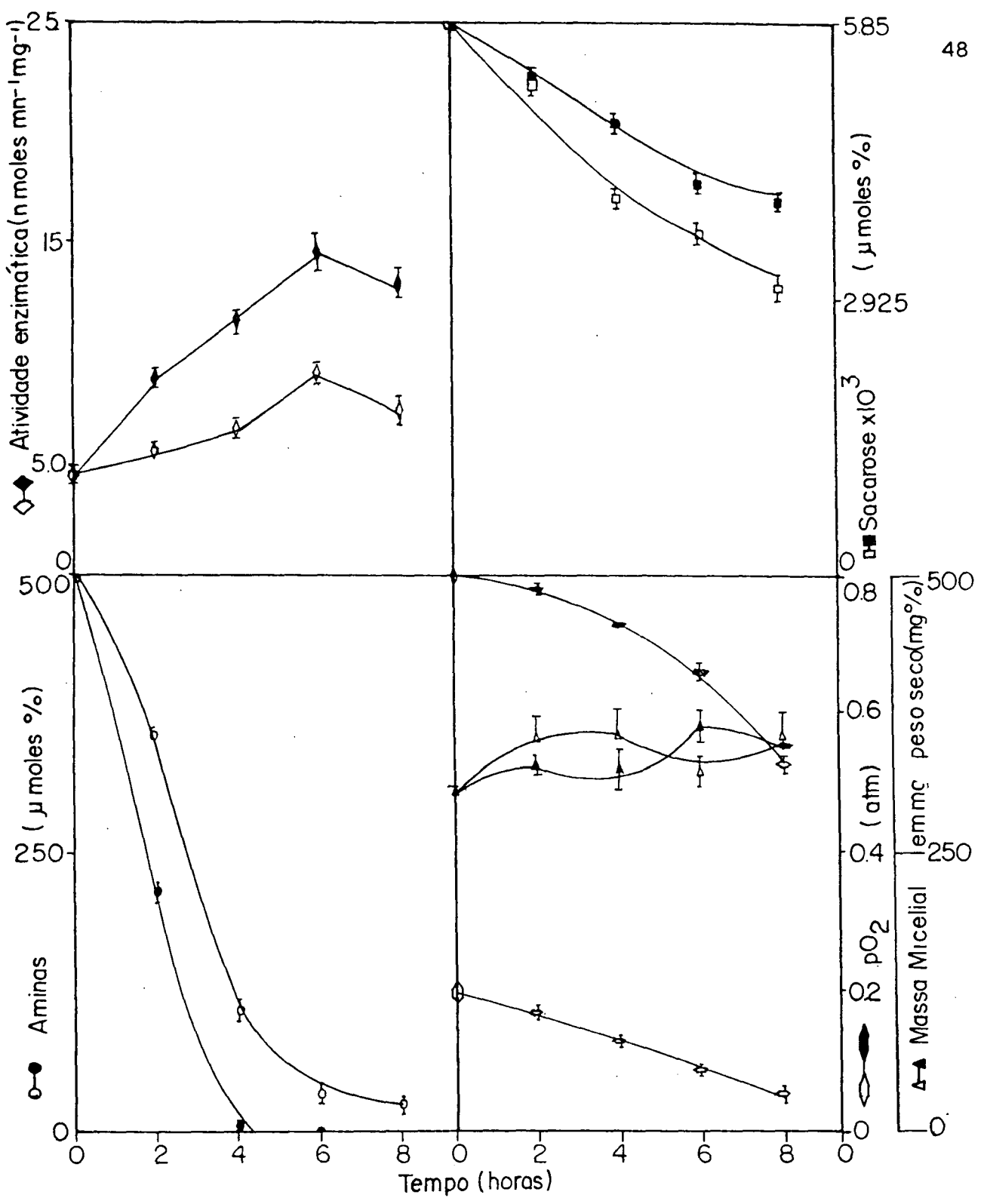


FIGURA 17 - Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Mutante nmr-1 (alelo V2M304)

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 02. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado ( n=2).

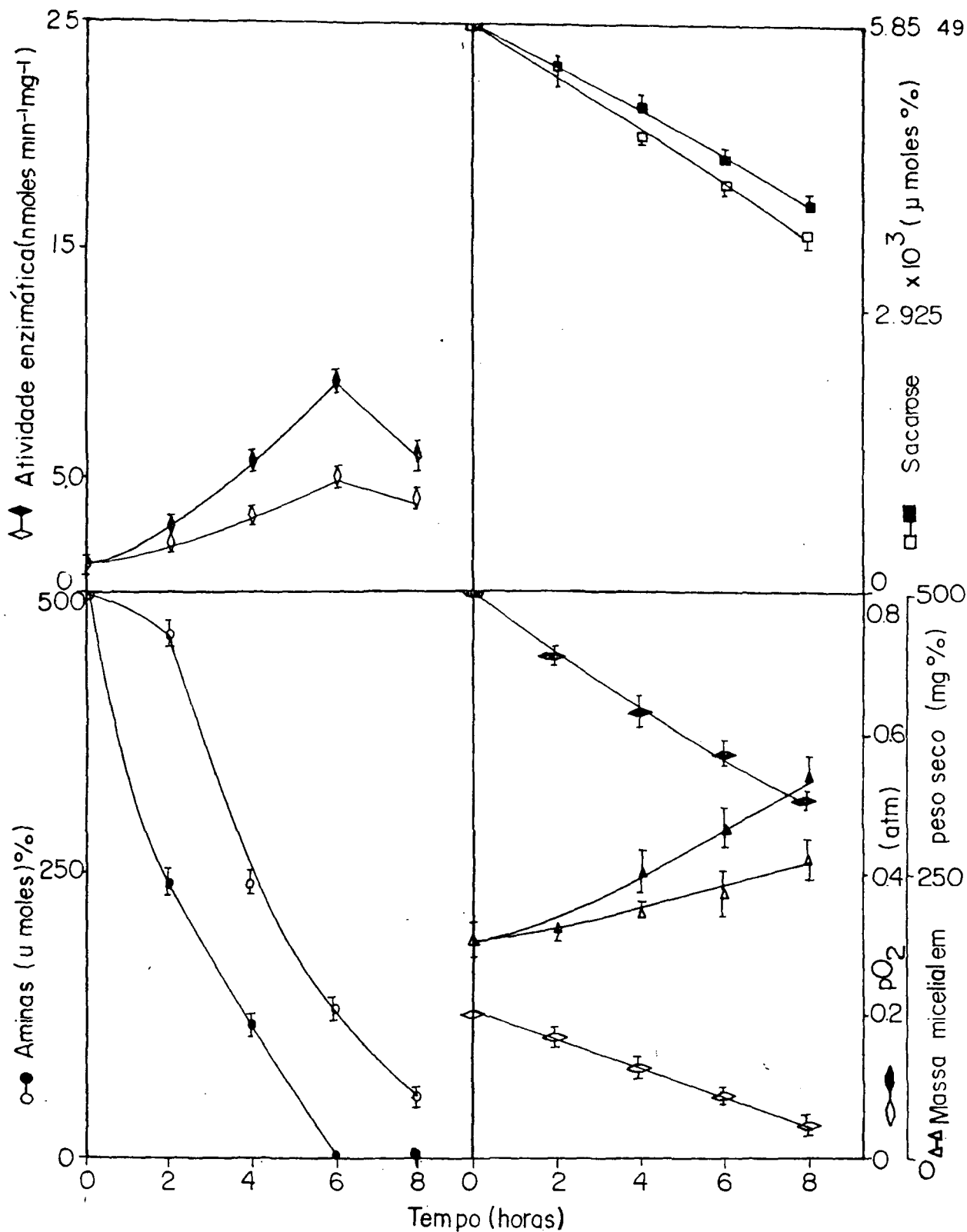


FIGURA 18 - Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Mutante nmr-1 (alelo MS5).

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 02. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

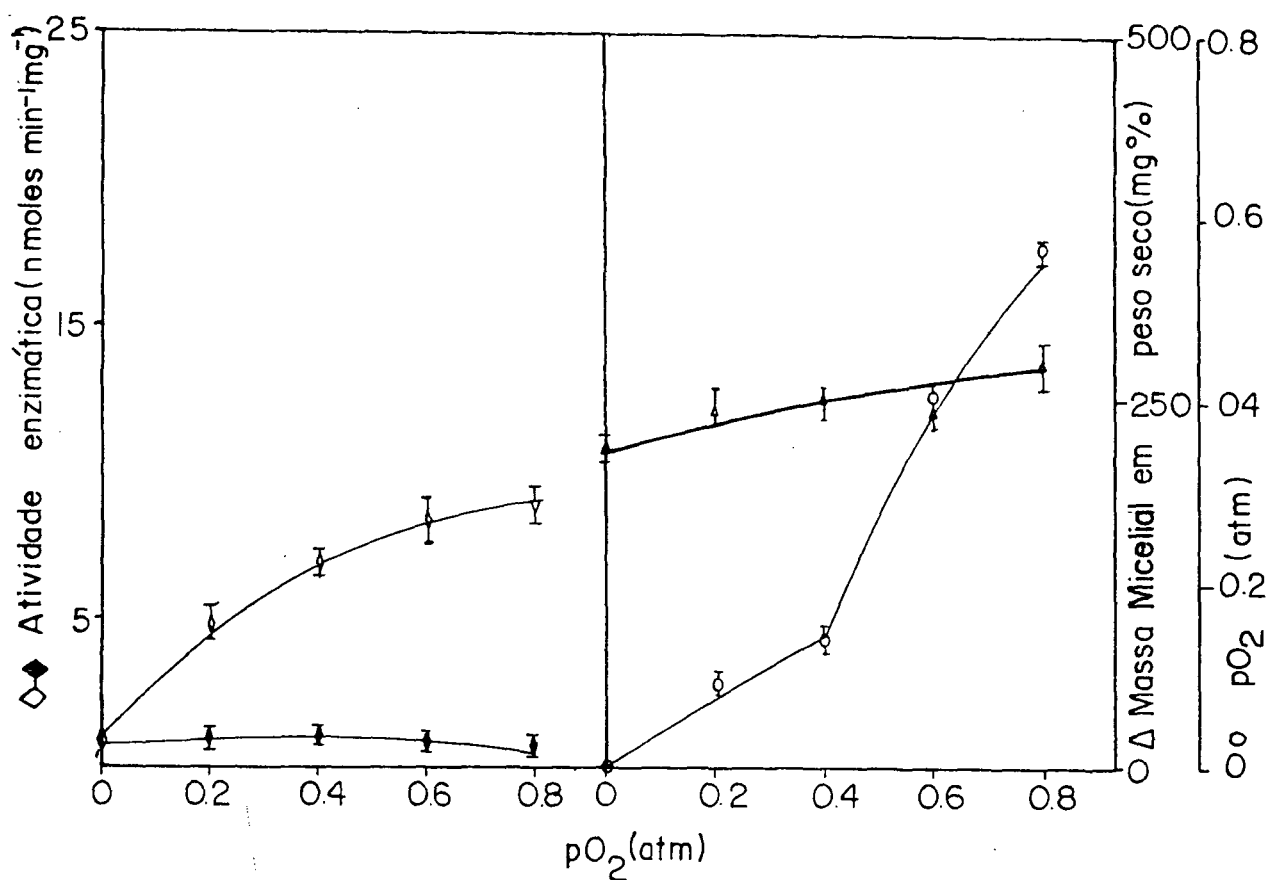


FIGURA 19 - Efeito da tensão de oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em condições de indução - Mutante nmr-1 (alelo MS5)

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 04. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado ( $n=2$ ).

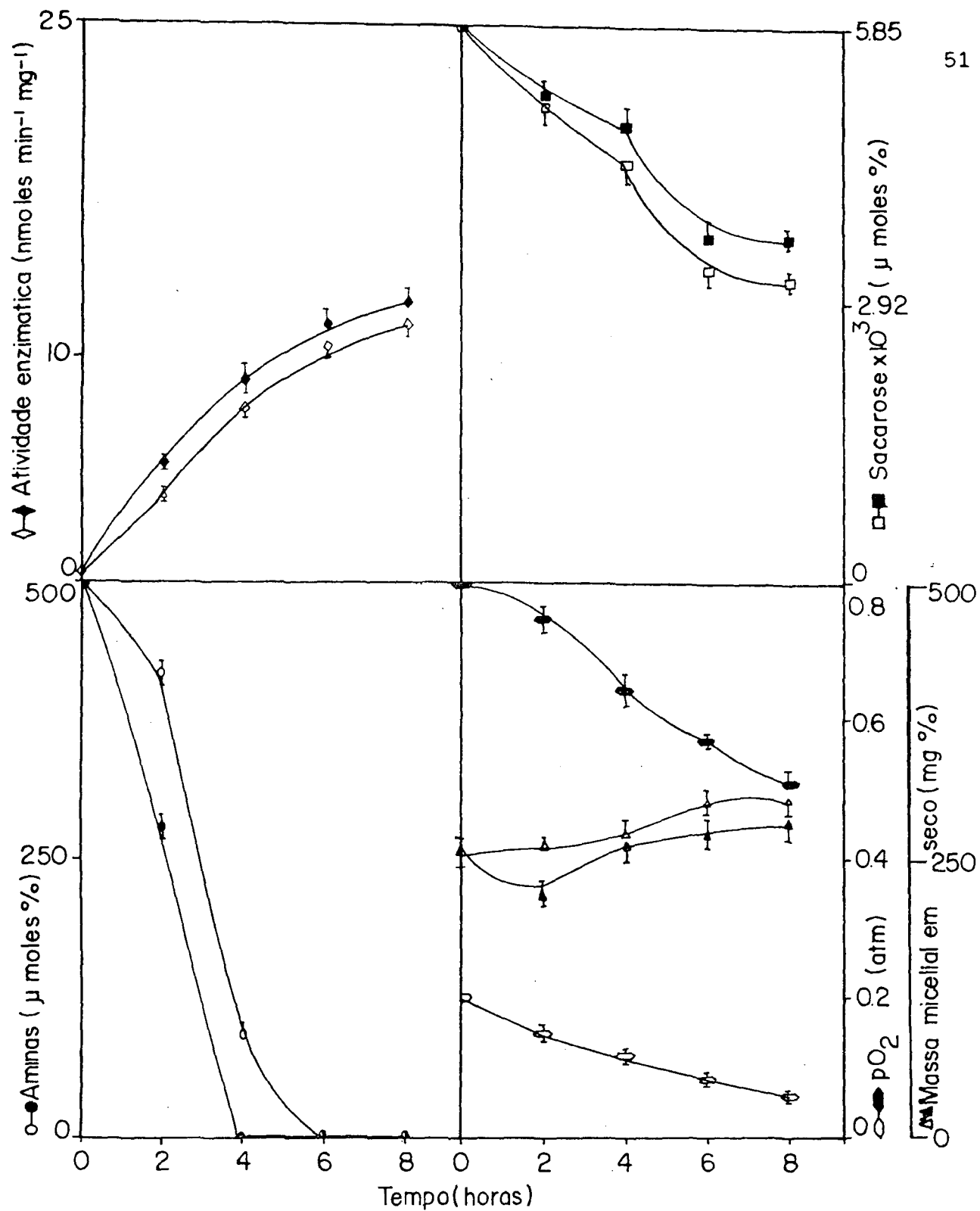


FIGURA 20 - Cinética de indução da L-aminoácido oxidase em diferentes tensões de oxigênio - Mutante en(am)1

As condições experimentais e os símbolos correspondem àqueles descritos na figura 02. Os valores representam a média e o desvio padrão de cada resultado (n=2).

#### 4. DISCUSSÃO

Quando células de Neurospora crassa linhagem selvagem, crescidas em meio mínimo de Vogel com 25 mM de íons amônio foram ressuspensas em meio de cultivo contendo L-leucina ou ácido úrico como única fonte de nitrogênio, sendo a concentração de oxigênio 0,2 atm., observou-se um aumento gradativo nas atividades de L-aminoácido oxidase e urato-oxidase. Em 6 horas de indução a L-aminoácido oxidase atingiu seus níveis máximos, enquanto que para a urato-oxidase o mesmo ocorreu em 8 horas. A indução destas enzimas, nestas condições foi semelhante àquela observada por Sikora e Marzluf (52) e Wang e Marzluf (60), respectivamente.

Aumentando a concentração de oxigênio na fase gasosa para 0,8 atm foi observado um aumento de 2,2 vezes nos níveis de atividade da L-aminoácido oxidase na linhagem selvagem. Igualmente os níveis de atividade da urato-oxidase sofreram aumentos de 2,0 vezes, quando comparados aos níveis observados a 0,2 atm na linhagem selvagem. Aumentos nos níveis de atividade enzimática decorrentes de maior concentração de oxigênio na fase gasosa foram relatados em bactérias (04,24,26,42,63,65), leveduras (40,48,56) e fungos (02,05,44).

Ao se variar a concentração de oxigênio na fase gasosa de zero a 0,8 atm., observou-se elevação nos níveis de atividade da L-aminoácido oxidase de 21,42 vezes para a linhagem selvagem (figura 04). Este aumento é compatível com aqueles observados para as enzimas respiratórias de Micobacterium phlei de 2 a 20 vezes (24), ou para a citocromo "c" oxidase de Saccharomyces cerevisiae de 5 vezes (40), ou ainda para a galactose oxidase de D.dendroides de 10,4 vezes (45), ou mesmo para as enzimas do sistema lignolítico de Phanerochaete chrysosporium (02). Mas são menores do que os

observados com a amino oxidase de D.dendroides de 196 vezes. O menor aumento com a L-aminoácido oxidase talvez seja decorrente da não utilização da L-leucina como fonte de carbono em presença de sacarose pelo N.crassa(52), o que ocorre com a n-butilamina pelo D.dendroides (07).

A possibilidade do aumento dos níveis de atividades enzimáticas ser devido a melhoria nas condições fisiológicas do fungo, considerando que o consumo de fontes nitrogenadas, L-leucina e ácido úrico, e o de oxigênio foi também maior, pode ser minimizada, já que nas condições ensaiadas não houve variação significativa da massa micelial.

Os níveis de atividade de L-aminoácido oxidase permaneceram constantes quando as células plenamente induzidas foram transferidas para meio isento de indutor, a 0,2 ou 0,8 atm de oxigênio e mantidas nestas tensões por 6 horas. Estes dados descartam a possibilidade do efeito do oxigênio sobre os níveis de atividade enzimática ser decorrente da proteção da inativação desta enzima in vivo.

Ressuspendendo células de N.crassa em meio de indução contendo concentrações crescentes de íons amônio (zero a 5 mM); ou em meio com concentrações fixas de íons amônio, por diferentes tempos, observou-se decréscimos ou mesmo ausência dos níveis de atividade enzimática em micélios expostos a 0,2 atm de oxigênio. A repressão da síntese da L-aminoácido oxidase e urato-oxidase em presença de fontes preferenciais de nitrogênio (amônio, glutamato ou glutamina) já havia sido descrita anteriormente por Sikora e Marzluf (52) e Wang e Marzluf (60).

Nas condições de repressão, descritas acima, maiores níveis de atividade enzimática foram detectados em micélios expostos a tensões de 0,8 atm de oxigênio (figuras 5-8). A análise do consumo de íons amônio pelas células, e dos seus níveis intracelulares, parece indicar não serem as maiores atividades enzimáticas

observadas, decorrentes de ausência do repressor. Os mesmos dados sugerem a existência de dois sistemas transportadores para o amônio, sendo um dependente de oxigênio.

Em condições de repressão (figura 05 e 06), observou-se uma diminuição no consumo de L-leucina e de ácido úrico proporcional ao aumento da concentração de íons amônio no meio de cultivo. Este dado está de acordo com o que se conhece sobre transporte de aminoácidos e purinas em Neurospora crassa. O fungo apresenta três sistemas de transportadores de aminoácidos, os quais são controlados pelo nível intracelular de aminoácidos e reprimidos por amônio (12, 62). Para o transporte de purinas, este ascomiceto, apresenta uma permease igualmente reprimida por amônio, mas que não sofre indução por substrato (58).

Quando células de mutante nit-2 (figuras 09 e 10) foram colocadas em condições de indução, aparentemente não se observou variações significativas nos níveis de atividade de L-aminoácido oxidase e urato-oxidase. Estes resultados confirmam a importância do gene nit-2 para a expressão destas enzimas (20, 23, 41, 57, 60). O oxigênio aumentou a velocidade de síntese da enzima, sugerindo que ele poderia estar ativando um sistema de desrepressão. Os dados ainda sugerem que o oxigênio por si só, não exerce efeito indutivo sobre a síntese das enzimas.

Os resultados observados em condições de repressão com a linhagem selvagem sugerem que o oxigênio poderia estar dificultando a ligação entre o catabólito repressor efetivo (glutamina) e a proteína NIT-2, visto ser esta proteína necessária para a expressão dos genes estruturais da L-aminoácido oxidase e urato-oxidase (23, 52).

O efeito do oxigênio sobre a velocidade de indução nas mutantes defectivas do gene nmr-1 foi semelhante ao observado com a linhagem selvagem. Como estas mutantes não têm o controle negati-

vo para a expressão da L-aminoácido oxidase, o efeito do oxigênio em condições de desrepressão foi menor do que o tipo selvagem. Assim possivelmente o efeito do oxigênio seria explicado, em parte, pela inativação do produto do gene nmr-1, ou mesmo por alteração de sua transcrição. Esta possibilidade foi aventada pelo fato do gene nmr-1 provavelmente codificar uma proteína, que associada à glutamina, inativaria a proteína NIT-2 (23).

Quando se compara a cinética de indução a 0,2 atm de oxigênio em condições de indução, da linhagem selvagem com a da mutante gln-1b observa-se que os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase são mais baixos do que se esperaria. Esta observação poderia indicar que a glutamina sintetase facilitaria a expressão do gene nit-2 como sugere Fu e Marzluf (20). Os níveis de atividade enzimática são três vezes superiores nos micélios expostos a 0,8 atm. de oxigênio do que a 0,2 atm descartando-se assim a possibilidade do efeito do oxigênio ser devido a um decréscimo nos níveis intracelulares de glutamina.

O fato de não haver variação nos níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em mutante en(am)1 em presença de amônio (tabela II) sugere a ausência de um sistema repressor atuante nesta mutante, como já postulado por Chambers et. al. (08). Também, não se observa alterações nos níveis de atividade com o aumento da tensão de oxigênio, em condições de indução. Assim, a mutação no gene en(am)1 torna a síntese da L-aminoácido oxidase insensível à repressão por amônio e à ativação por oxigênio, sugerindo que este gene deve ser sensível a ambos os sinais.

Como era esperado, o comportamento da mutante nit-4 foi semelhante àquele observado no tipo selvagem, frente ao oxigênio em condições de indução (figuras 11 e 13) e mesmo em presença de repressor (figuras 14 e 15), para as duas enzimas. Os níveis de atividade enzimática a 0,2 atm de oxigênio foram 82 % inferiores

aos obtidos com a linhagem selvagem, em condições de desrepressão, sugerindo que o gene nit-4 está envolvido na expressão desta enzima como está para as enzimas nitrato e nitrito redutases (41). Isto não ocorre no caso da urato-oxidase, logo, o gene nit-4, poderia não controlar a expressão da urato-oxidase.

As razões de indução da L-aminoácido oxidase mais elevadas com a mutante nit-4, em presença de 0,8 atm de oxigênio, poderiam ser explicadas pelo fato da velocidade de indução a 0,2 atm ser muito baixa. A curva sigmoidal observada, quando se variou a tensão de oxigênio (figura 12) poderia indicar que a molécula do indutor não estivesse prontamente disponível, no entanto o consumo de L-leucina é similar ao da linhagem selvagem. Uma outra possibilidade seria que uma segunda enzima passasse a ser sintetizada em altas tensões de oxigênio, o que pode ser excluído visto que se obteve uma única banda de atividade da L-aminoácido oxidase, tanto na mutante nit-4 quanto na linhagem selvagem, a 0,2 e 0,8 atm de oxigênio (dados não mostrados). Sikora e Marzluf (52) já havia constatado apenas uma atividade da L-aminoácido oxidase em extrato livre de células da linhagem selvagem.

O efeito indutor do oxigênio sobre as duas oxidases de N. crassa estudadas, é compartilhado por outras oxidases de outros fungos (07, 40, 47). Como o oxigênio é substrato para as oxidases, uma explicação seria que ele induziria a síntese de oxidases em fungos. O mecanismo molecular pelo qual ele afetaria a expressão de oxidases poderia ser via um controle genético específico. Assim, algum gene, responsável pela indução de oxidases, seria expresso quando este elemento estivesse presente. O produto deste gene favoreceria a expressão dos genes estruturais para as enzimas, ou mesmo genes regulatórios destes genes regulatórios destes genes estruturais. Uma outra possibilidade talvez fosse a sugerida por Yamamoto et al. (66) segundo a qual, maiores níveis da enzima

topoisomerase I, são observados em aerobiose, em Salmonella thyphimurium. Assim, maiores concentrações de oxigênio resultaria em maior atividade de topoisomerase I, favorecendo a exposição dos promotores do genes estruturais para que as proteínas regulatórias, no caso de N.crassa, a NIT-2, os reconhecessem com maior facilidade, resultando assim, em maior número de moléculas de enzimas.

Os dados aqui apresentados sugerem que as oxidases estudadas estariam, também, sobre o controle do circuito do nitrogênio, o que já é conhecido (41), e isto não permite descartar a possibilidade do oxigênio participar do controle destes genes. Nas mutantes testadas o efeito do oxigênio foi verificado, com exceção da mutante en(am)1. Ao lado do gene nit-2, este gene deve ter participação na indução da L-aminoácido oxidase. O gene en(am)1 poderia estar sendo ativado por oxigênio e reprimido por metabólitos de nitrogênio, como ocorre com a expressão do operom hut em Klebsiella pneumoniae (25). O que é distinto do observado em A.nidulans para a expressão da timina-7-hidroxilase (53) e para a nitrogenase de K. pneumoniae (32), ambas reprimidas por oxigênio e catabólitos de nitrogênio.

Outras possibilidades sobre o efeito do oxigênio na expressão da L-aminoácido oxidase e urato-oxidase não podem ser descartadas. Assim, o oxigênio poderia estar afetando a transcrição de genes específicos, como no caso do gene fnr em E.coli (55), ou alterando a estabilidade dos transcritos, conforme verificado na biossíntese de carotenóides em R.capsulatus (67), ou ainda a tradução destes transcritos de acordo com o observado em S.cerevisiae, onde a tradução do gene pet494 está sendo afetada por oxigênio (40).

Os estudos até agora realizados não permitem postular o mecanismo pelo qual o oxigênio estaria afetando a expressão das

oxidases, embora se possa admitir que ele atue em mais de um local. Assim, o isolamento de transcritos dos genes envolvidos neste circuito estudado, bem como sua tradução "in vitro" poderiam e lucidar o real efeito do oxigênio. O estudo com mutantes anaeróbicas facultativas deste fungo, isoladas por Howell como descrito por Perkins et al. (46), poderia contribuir nesta elucidação.

## 5. CONCLUSÕES

1. A exposição dos micélios de Neurospora crassa a tensões variáveis de oxigênio, em presença do indutor, provoca um aumento nos níveis de atividade de L-aminoácido oxidase e urato-oxidase.
2. O efeito repressor dos íons amônio foi menor a 0,8 atm de oxigênio do que a 0,2 atm, quando se mediu os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase e urato-oxidase.
3. Mutações nos genes nit-2, gln-1b e nmr-1 (alelos V2M304 e MS5) não impedem o efeito do oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em condições de indução.
4. Mutação no gene nit-4 não elimina o efeito do oxigênio sobre a variação dos níveis de atividade das enzimas estudadas em condições de indução e de repressão.
5. O efeito do oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase das mutantes gln-1b e nmr-1 é diminuído em presença de 0,5 mM de íons amônio.
6. Mutação no gene en(am)1 elimina o efeito do oxigênio sobre os níveis de atividade da L-aminoácido oxidase em condições de indução e de repressão.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AISAKA, K. & TERADA, O. Production of galactose oxidase by Gibberella fujikuroi. Agric. Biol. Chem., 45(10): 2311-2316, 1981.
2. BAR-LEV, S.S. & KIRK, T.K. Effects of molecular oxygen on lignin degradation by Phanerochaete chrysosporium. Biochem. Biophys. Res. Commun., 99(2): 373-378, 1981.
3. BEAMAN, L. & BEAMAN, B.L. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. Ann. Rev. Microbiol., 38: 27-48, 1984.
4. BEELEN, P.V.; HOEVEN, J.S.V.; JONG, M.H. de & HOOGENDOORN, H. The effect of oxygen on the growth and acid production of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis. FEMS microbiol. Ecol., 38: 25-30, 1986.
5. CALDWELL, P.H. Effects of high partial pressures of oxygen on fungi and bacteria. Nature, 206: 321-323, 1965.
6. CANNON, F.; BEYNON, J.; BUCHANAN-WOLLASTON, V.; BURGHOFF, R.; CANNON, M.; KWIATKOWSKI, R.; LAUER, G & RUBIN, R. Progress in understanding organization and expression of nif genes in Klebsiella. IN: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J. & NEWTON, W. E.(eds). Nitrogen fixation research progress. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p. 453-460.
7. CAVICHILOLO, M.H. & ZANCAN, G. Nitrogen and oxygen regulation of amino oxidase in Dactylium dendroides. Exp. Mycol., 12: 70-76, 1988.
8. CHAMBERS, J.A.; GRIFFON, S.M. & MARZLUF, G.A. Trans-nuclear action of the nit-2 regulatory gene product and study of two additional nitrogen control genes in N.crassa. Curr. Genetics, 7: 51-56, 1983.

9. CHAMBERS, J.A. & WILKINS, S.A. A regulatory phenotype associated with the en(am)1 mutant of Neurospora crassa. Curr. Genetics, 6: 87-90, 1982.
10. CHANEY, A.L. & MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem., 8(2): 130-132, 1962.
11. DAVIS, M.A. & HYNES, M.J. Regulatory genes in Aspergillus nidulans. Trends Genet., 5(1): 14-19, 1989.
12. DEBUSK, R.M. & DEBUSK, A.G. Physiological and regulatory properties of the general amino acids transport system of Neurospora crassa. J. Bacteriol., 143(1): 188-187, 1980.
13. DEBUSK, R.M. & OLGIVIE, S. Nitrogen regulation of amino acid utilization by Neurospora crassa. J. Bacteriol., 160(2): 493-498, 1984.
14. DEBUSK, R.M. & OLGIVIE, S. Regulation of amino acid utilization in Neurospora crassa: effect of nmr-1 and ms-5 mutations. J. Bacteriol., 160(2): 656-661, 1984.
15. DUBIN, D. The assay and characterization of amines by means of 2,4-dinitrofluorobenzene. J. Biol. Chem., 235(3): 783-786, 1960.
16. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356, 1956.
17. DUNN-COLEMAN, N.S. & GARRET, R.H. Effect of the gln-1b mutation on nitrogen metabolite repression in Neurospora crassa. J. Bacteriol., 145(2): 884-888, 1981.
18. DUNN-COLEMAN, N.S.; TOMSETT, A.B. & GARRET, R.H. The regulation of nitrate assimilation in Neurospora crassa: biochemical analysis of the nmr-1 mutants. Mol. Gen. Genet., 182: 234-239, 1981.
19. FRIDOVICH, J. Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23: 239-257, 1983

20. FU, Y. & MARZLUF, G.A. Characterization of nit-2, the major nitrogen regulatory gene of Neurospora crassa. Mol. Cell. Biol., 7(5): 1691-1696, 1987.
21. FU, Y. & MARZLUF, G.A. Molecular cloning and analysis of the regulation of nit-3, the structural gene for nitrate reductase in Neurospora crassa. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 84: 8243-8247, 1987.
22. FU, Y. & MARZLUF, G.A. Metabolic control and autogenous regulation of nit-3, nitrate reductase structural gene of Neurospora crassa. J. Bacteriol., 170(2): 657-661, 1988.
23. FU, Y. & MARZLUF, G.A. Molecular cloning and characterization of a negative-acting nitrogen regulatory gene of Neurospora crassa. Mol. Gen. Genet., 214: 74-79, 1988.
24. GILLESPIE, J.; BARTON, L. & RYPKA, E.W. Influence of oxygen tension on the respiratory activity of Mycobacterium phlei. J. Gen. Microbiol., 134: 247-252, 1988.
25. GOLDBERG, R. & HANAU, R. Regulation of Klebsiella pneumoniae hut operon by oxygen. J. Bacteriol., 141(2): 745-750, 1980.
26. GOTTLIEB, S.F. & PACKMAN, L.M. Effect of high oxygen tensions on the growth of selected aerobic gram-negative pathogenic bacteria. J. Bacteriol., 95: 1003-1010, 1968.
27. GRISWOLD, W.R.; MADRID, V.O.; SHAFFER, P.M.; TAPPEN, D.C. ; PUGH, C.S.G. & ABBOTT, M.T. Regulation of thymidine metabolism in Neurospora crassa. J. Bacteriol., 125(3): 1040-1047, 1976.
28. GROVE, G. & MARZLUF, G.A. Identification of the product of major regulatory gene of the nitrogen control circuit of Neurospora crassa as a nuclear DNA binding protein. J. Biol. Chem., 256(1): 463-470, 1981.

29. GUNDERSEN, K. The growth and respiration of Nitrocystis oceanus at different partial pressures of oxygen. J. Gen. Microbiol., 42: 387-396, 1966.
30. HERNANDEZ, D. & ROWE, J.J. Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying Pseudomonas aeruginosa. Appl. Environ. Microbiol., 53(4): 745-750, 1987.
31. HILL, S.; KENNEDY, C.; KAVANAGH, E.; GOLDBERG, R.B. & HANAU, R. Nitrogen fixation gene (nifL) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in K.pneumoniae. Nature, 290 (5805): 424-426, 1981.
32. HILL, S. How is nitrogenase regulated by oxygen? FEMS Microbiol. Rev., 54: 111-130, 1988.
33. HODGMAN, C.D. (ed.) Handbook of chemistry and physics. 42 ed. New York, The chemical Rubber Publishing CO., 1960. p. 618-619.
34. HURBERT, R.E. Effect of oxygen on viability and substrate utilization on Chromatium. J. Bacteriol., 93: 1346-1352, 1967.
35. IUCHI, S. & LIN, C.C. The narL gene product activates the nitrate reductase operon and represses the fumarate reductase and trimethylamine N-oxide reductase operons in Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 84: 3901-3905, 1987.
36. JOHNSON, M.J. Aerobic microbial growth at low oxygen concentration. J. Bacteriol., 94: 101-108, 1967.
37. KAPRALEK, F.E.; JECHOVA, E. & OTAVOVA, M. Two sites of oxygen control in induced synthesis of respiratory nitrate reductase in E.coli. J. Bacteriol., 149: 1142-1145, 1982.
38. LINNANE, A.W.; VITOLS & NOWLAND, P.G. Studies on the origin of mitochondria. J. Cell. Biol., 13: 345-350, 1963.
39. LOWRY, O.R.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin reagent. J. Biol. chem., 193: 265-275, 1951.

40. MARYKWAS, D. & FOX, T.D. Control of the Saccharomyces cerevisiae regulatory gene pet494: transcriptional repression by glucose and translational induction by oxygen. Mol. Cell. Biol., 9(2): 484-491, 1989.
41. MARZLUF, G.A. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbiol. Rev., 45(3): 437-461, 1981.
42. MIKELL, A.T.Jr.; PARKER, B.C. & GREGORY, E.M. Factors affecting high-oxygen survival heterotrophic microorganisms from an antarctic lake. Appl. Exp. Microbiol., 52(6): 1238-1241, 1986.
43. NAHN, B.H. & MARZLUF, G.A. Induction and de novo synthesis of uricase, a nitrogen-regulated enzyme in Neurospora crassa. J. Bacteriol., 169(5): 1943-1948, 1987.
44. NATVIG, D.O. Comparative biochemistry of oxygen toxicity in lactic acid-forming aquatic fungi. Arch. Microbiol., 132: 107-114, 1982.
45. PEDROSA, F.O. & ZANCAN, G.T. Effect of oxygen on galactose oxidase synthesis and secretion in Dactylium dendroides. Exp. Mycol., 10(2): 126-130, 1986.
46. PERKINS, D.D.; RADFORD, A.; NEWMAYER, D. & BJÖRMAN, M. Chromosomal loci of N.crassa. Microbiol. Rev., 46(4): 426-570, 1982.
47. PERRINE, K.G. & MARZLUF, G.A. Amber nonsense mutations in regulatory and structural genes of the nitrogen control circuit of Neurospora crassa. Curr. Genetics, 10: 677-684, 1986.
48. POLARIS, E.S.; BARTTLEY, W. & MEEK, P.G.A. Changes in the structure and enzymes activity of Saccharomyces cerevisiae in response to changes in the environment. Biochem. J., 90: 369-374, 1964.

49. PREMAKUMAR, R.; SORGER, G.J & GOODEN, D. Physiological characterization of a N.crassa mutant with impaired regulation of nitrate reductase. J. Bacteriol., 144(2): 542-551, 1980.
50. RACKER, E. D-Sedoheptulose-7-phosphate. IN: BERGERMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. 2ed. New York, Verlag-chemie, 1965. p. 107-110.
51. REINERT, W.R. & MARZLUF, G.A. Genetic and metabolic control of the purine catabolic enzymes of Neurospora crassa Mol. Gen. Genet., 139: 39-55, 1975.
52. SIKORA, L. & MARZLUF, G.A. Regulation of L-amino acid oxidase and D-amino acid oxidase in Neurospora crassa. Mol. Gen. Genet., 186: 33-39, 1982.
53. SHAFFER, P.M. & ARST Jr., H.N. Regulation of pyrimidine salvage in Aspergillus nidulans: a role for the major regulatory areA gene mediating nitrogen metabolite repression. Mol. Gen. Genet., 198: 139-145, 1984
54. SHAFFER, P.M.; ESTBERG, L.; FERNANDO, L. & SITTER, M. Amidohydrolases regulated by areA300 in Aspergillus nidulans. Fed. Proc., 45: 1546, 1986.
55. SHAW, D.J. & GUEST, J.R. Amplification and product identification of the fnr gene of Escherichia coli. J. Gen. Microbiol., 128: 2221-2228, 1982.
56. SOMLO, M. & FUKUHARA, H. On the necessity of molecular oxygen for the synthesis of respiratory enzymes in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun., 19(5): 587-591, 1965.
57. STEWART, V. & VOLLMER, S.J. Molecular cloning of nit-2, a regulatory gene required for nitrogen metabolite repression in Neurospora crassa. Gene, 46: 291-295, 1986.
57. TSAO, T. & MARZLUF, G.A. Genetic and metabolic regulation of purine base transport in Neurospora crassa. Mol. Gen. Genet., 149: 347-355, 1976.

59. VOGEL, H.J. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. Am. Naturalist, 98: 435-446, 1964.
60. WANG, L.C. & MARZLUF, G.A. Nitrogen regulation of uricase synthesis in Neurospora crassa. Mol. Gen. Genet., 176: 385-392, 1979.
61. WIAME, J.M.; GRENSON, M. & ARST Jr., H.N. Nitrogen catabolites repression in yeasts and filamentous fungi. Adv. Microbial. Phys. 26: 1-88, 1985.
62. WILEY, W.R. & MATCHETT, W.H. Tryptophan transport in Neurospora crassa II - metabolic control. J. Bacteriol., 95(3): 959-966, 1968.
63. WIMPENNY, J.W.T. Oxygen and carbon dioxide as regulators of microbial growth and metabolism. XIX Symposium Soc. Gen. Microbiol. 161-167, 1965.
64. WIMPENNY, J.W.T.; GRAY, C.T.; HUGHES, D.E. & MOSSMAN, M.R. Regulation of metabolism in facultative bacteria. I- Structural and functional changes in E.coli associated with shifts between the aerobic and anaerobic states. Biochem. Biophys. Acta, 117: 22-32, 1966.
65. WIMPENNY, J.W.T.; GRAY, C.T. & MOSSMAN, M.R. Regulation of metabolism in facultative bacteria. II- Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in E.coli. Biochem. Biophys. Acta, 117: 33-41, 1966.
66. YAMAMOTO, N. & DROFFNER, M. L. Mechanisms determining aerobic or anaerobic growth in the facultative anaerobe Salmonella typhimurium. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 82: 2077-2081, 1985.

67. ZHU, Y.S.; COOK, D.N.; LEACH, F.; ARMSTRONG, G.A.; ALBERTIE , M. & HEARST, J.E. Oxygen-regulated mRNAs for light-harvesting and reaction center complexes and for bacteriochlorophyll and carotenoid biosynthesis in Rhodobacter capsulatus during the shift from anaerobic to aerobic growth. J. Bacteriol.,168(3): 1180-1188, 1986.